



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Inverkan av juverhälsostatus på variation i mjölkens sammansättning och innehåll av utvalda inflammatoriska markörer

Marie Boman

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:3*

Inverkan av juverhälsostatus på variation i mjölkens sammansättning och innehåll av utvalda inflammatoriska markörer

Marie Boman

Handledare: Karin Östensson, Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Bitr. handledare: Maria Åkerstedt, Institutionen för Husdjurens Utfodring och Vård
Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska vetenskaper

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp

Nyckelord: Mjölkkö, juverhälsostatus, subklinisk mastit, inflammationsindikatorer, mjölksammansättning, variation

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:3

FÖRKORTNINGAR

AP	Alkalint fosfatas
CMT	California Mastitis Test
hb	Juverdelen höger bak
HC	Höga celltal
HCB+	Höga celltal och bakteriologiskt positiv
hf	Juverdelen höger fram
Hp	Haptoglobin
LC	Låga celltal
LDH	Laktatdehydrogenas
NAGase	N-acetyl- β -D-glukosaminidas
SAA	Serum amyloid A
SCC	Somatic cell count; celltal i mjölk
vb	Juverdelen vänster bak
vf	Juverdelen vänster fram

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Abstract	2
Inledning	3
Litteraturöversikt	4
Juveranatomi och fysiologi	4
Mastit	5
Inflammationsreaktionen och celltalet i mjölk	5
Mjölksammansättning	6
Några utvalda humorala inflammationsparametrar	7
Haptoglobin och serum amyloid A	7
Laktatdehydrogenas, N-acetyl- β -D-glukosaminidas och alkalint fosfatas ..	7
Laktos	8
Variation av celltal i mjölk	8
Studien: Inverkan av juverhälsostatus på variation i mjölkens sammansättning och innehåll av utvalda inflammatoriska markörer	9
Syftet med den aktuella studien	9
Frågeställningar	10
Material och metoder	10
Försöksuppläggning	10
Mjölkning och provinsamling	10
Analyser	11
Mjölkinnehåll och inflammationsindikatorer	11
Bakteriologisk odling	12
Statistisk analys	12
Resultat	13
Rådata från de enskilda korna	15
Ko med låga celltal (LC)	16

Ko med höga celltal i hf (HC)	17
Ko med höga celltal i hf och vb och bakteriologiskt positiv i vb (HCB+)	20
Hur förändras parametrarna i samlingsproven i förhållande till juverfjärdedelsproven?.....	24
Diskussion.....	25
Konklusioner.....	29
Tack	29
Litteraturförteckning	30

SAMMANFATTNING

Mastit är den vanligaste och mest kostsamma sjukdomen hos mjölkkor. Enligt statistik från Svensk Mjolk har cirka 65 % av alla kor i Sverige mastit någon gång under en laktation. Subklinisk (utan märkbara symtom) mastit utgör det största problemet. De är svåra att upptäcka då även mjölken ser normal ut, vilket resulterar i att den hamnar i tanken och levereras till mejeriet. Mjolk från kor med mastit har ett ökat celltal samt försämrad kvalitet och sammansättning vilket i slutändan medför sämre betalt för lantbrukaren. Kor med infektiös mastit riskerar även att sprida smittan vidare i besättningen vilket kan ge katastrofala följder för den enskilda företagaren.

Somatic cell count (SCC), det vill säga cellkoncentrationen i mjölken, används idag som metod för att upptäcka subklinisk mastit. SCC mäts i tanken vid varje leverans till mejeriet och vid den individuella provmjölkningen som sker månadsvis av alla kor i ko-kontrollen. Men räcker denna provtagning? Kan man med ett individuellt samlingsprov per månad av mjölken från hela juvret utesluta att kon har mastit i någon juverdel? Finns det någon annan mastitindikator som detekterar kor med mastit säkrare än SCC?

Syftet med denna studie var att utifrån juverhälsostatus, hos några enskilda kor, studera variationen mellan mjölkningar hos ett antal inflammatoriska parametrar i mjolk och hur de förhåller sig till SCC. Dessutom studerades vissa av parametrarna i mjölkens sammansättning och relaterades till juverhälsostatus och SCC.

Mjolkprover på juverfjärdedelsnivå togs morgon och kväll under tre veckor i rad och analyserades med avseende på alkalint fosfatas (AP), haptoglobin (Hp), laktatdehydrogenas (LDH), N-acetyl- β -D-glukosaminidas (NAGase), serum amyloid A (SAA), SCC, kasein, laktos, totalprotein och vassle. Ett representativt samlingsprov togs även efter att försiktigt ha blandat ihop all fjärdedelsmjolk. Mjolkprover för bakteriologisk undersökning togs varje morgon på juverfjärdedelsnivå efter avslutad mjölkning.

Totalt provtogs 10 kor. Av dessa valdes tre ut, med olika juverhälsostatus baserat på SCC i samlingsmjolk samt bakteriologiskt status, för att studeras närmare. En ko hade lågt celltal och var bakteriologiskt negativ, en ko hade högt celltal och var bakteriologiskt negativ och en ko hade högt celltal och var bakteriologiskt positiv i en juverdel med växt av *Enterobacter cloacae* i renkultur.

Resultaten visar att den subkliniskt inflammerade kon med infektion hade störst variation gällande alla analyserade parametrar. Variationen hos den enskilda infekterade kon slog även igenom och gav en högre variation i hela gruppen av tio kor jämfört med samma grupp av kor där den infekterade kon var utesluten.

Av alla analyserade parametrar fanns det ingen parameter som i ett samlingsprov kunde urskilja kor med en ringgradigt subkliniskt inflammerad juverdel. Enbart SCC och SAA kunde på juverfjärdedelsnivå skilja en ringgradigt subkliniskt inflammerad juverdel från övriga juverdelar med lågt SCC medan flertalet av de

analyserade parametrarna kunde identifiera en subkliniskt inflammerad juverdel med infektion.

ABSTRACT

Mastitis is the most common and most costly disease among dairy cows. According to Swedish Dairy Association approximately 65 % of all cows in Sweden have mastitis some time during lactation. Subclinical (without detectable symptoms) mastitis constitutes the largest problem. The cases are difficult to detect since there are no visible symptoms in the milk and consequently this milk will be delivered to the dairy. Milk from cows with mastitis have an increased somatic cell count (SCC), i.e. the concentration of cells in milk, and deteriorated quality and composition that will result in milk price reduction for the farmer. There is also a potential risk that cows with infectious mastitis spread the infection to more cows in the herd which might result in devastating consequences for the individual entrepreneur.

Today SCC is the most commonly used method to detect subclinical mastitis. A sample from the bulk tank is collected for SCC analysis every time milk is delivered to the dairy plant, but also from each individual cow once a month in the Swedish cow-control system. Is it enough with one sampling occasion at cow level to detect udder health problems? Is it possible with an individual cow composite sample to detect mastitis in an udder quarter? Is there any other indicator to detect mastitis that is more reliable to use than SCC?

The aim of this study was to study the variation between milkings of a number of inflammatory parameters in milk and how they relate to SCC, i.e. the udder health status of the udder. In addition, some parameters in the milk's composition was studied and related to udder health and SCC.

Quarter milk samples were collected morning and evening during 42 consecutive milking occasions and were analyzed for alkaline phosphatase (AP), haptoglobin (Hp), lactate dehydrogenase (LDH), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase), serum amyloid A (SAA), SCC, casein, lactose, total protein and whey. A representative composite milk sample was collected after the milk from the 4 udder quarters had been carefully mixed. Quarter milk samples for bacteriological examination were taken after morning milking was completed.

In total 10 cows were included in the study. Three of those, with different udder health status, were chosen to study in detail. One cow had a low SCC and was bacteriologically negative, one cow had a high SCC and was bacteriological negative and one cow had a high SCC and was bacteriological positive in milk from one quarter with growth of *Enterobacter cloacae*.

The results from this study showed that the cow with subclinical mastitis and infection had the largest variation in all analyzed parameters among the 3 cows. The variation was considerably higher in the entire group of ten cows compared to the same group of cows when the subclinically infected cow was excluded.

None of the included parameters in this study could detect a mild subclinical inflamed quarter when analyzed in a cow composite milk sample. Only SCC and SAA could at udder quarter level identify a quarter with mild subclinical inflammation. The majority of the analyzed parameters could identify the subclinically inflamed quarter with infection.

INLEDNING

Trots omfattande forskning är mastit fortfarande den vanligaste och ekonomiskt mest förlustbringande sjukdomen hos mjölkkor. Enligt statistik från Svensk Mjolk har cirka 65 % av alla kor i Sverige mastit någon gång under en laktation. Den subkliniska (utan synbara symtom) formen av mastit utgör det största problemet. Klinisk mastit förekommer mer sällan. I husdjursstatistiken 2009 från Svensk Mjolk rapporterades att cirka 14 % av alla kor någon gång under laktationen veterinärbehandlas för mastit. Det är dock en underskattning av förekomsten av kliniska mastiter eftersom endast 78 % veterinärbehandlas (Mörk et al 2009) och rapporteringsgraden dessutom i genomsnitt bara är 75 % (Jansson Mörk et al 2009). Detta leder till uppskattningen att cirka 25 av 100 kor någon gång under laktationen drabbas av klinisk mastit.

Kliniska mastiter är oftast lätta att upptäcka för lantbrukaren, då juvret uppvisar symtom och mjölken är förändrad, medan de subkliniska är betydligt svårare. Vad finns det idag för hjälpmedel att upptäcka subkliniska mastiter i en besättning? Sedan mycket länge används koncentrationen av vita blodkroppar, det så kallade celltalet i mjölken (somatic cell count, SCC) som indikator på mastit. Celltalet i den levererade tankmjölken är en grov indikator på omfattningen av eventuella juverhälsoproblem i en besättning. Provmjölkningsprov av varje ko genomförs dessutom i de flesta besättningar en gång per månad. Den ger uppgift om vilket celltal kon har, men enbart i den samlade mjölken från juvret och just den dagen. Uppgifter från flera månader i rad visar dock en trendlinje för kon under laktationen och utgör ett säkrare underlag för att bedöma kons juverhälsostatus. Genom att regelbundet gå igenom provmjölkningsrapporterna och identifiera kor med höga celltal som misstänks ha subklinisk mastit och därefter undersöka deras juver på fjärdedelsnivå med California Mastitis Test (CMT) kan de enskilda juverdelar som har mastit hittas. CMT är en test som indikerar ungefärligt celltal i mjölken och som kan genomföras direkt i ladugården när prov på mjölken är taget. De juverdelar där mjölken har starka CMT-reaktioner bör provtas med avseende på infektion. Eftersom de subkliniska mastiterna förlöper utan synliga symtom är analys av celltal och bakterier i mjölken enda sättet att ha kontroll på vilka kor som har subkliniska juverinfektioner. Att känna till det är väsentligt därför att kor med infekterade juver riskerar att föra smittan vidare till andra kor och risken varierar beroende på vilken bakterie som orsakar infektionen.

Varför vill man ställa diagnos på de subkliniska mastiterna när man inte kan se att mjölken har några förändringar? Finns det pengar att tjäna? Kor med subklinisk mastit får nedsatt mjölkproduktion och förändrad sammansättning (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981) vilket orsakar lantbrukaren stora förluster. Betalningen för mjölken baseras också delvis på celltalet, ett högre celltal ger lägre betalt och vid återkommande kraftigt höga celltal i tanken kan man stängas

av från mejeriet. Anledningen är att ett ökat celltal är relaterat till icke önskvärda förändringar i mjölkens sammansättning. Bland annat minskar utbytet vid osttillverkningen och mjölkens hållbarhet vid lagring försämras. Mjölkens celltal i en mastitfri juverdel ska vara lägre än 100 000 celler/ml, men den övre acceptabla gränsen för celltal i tankmjölk som ska levereras till mejeriet är inom EU 400 000 celler/ml. Även med ett betydligt lägre tankmjölkscelltal är det uppenbart att mjölk från en stor andel kor med förhöjda celltal kan dölja sig. Det innebär att mjölken från dessa kor med subklinisk mastit regelmässigt levereras till mejeriet.

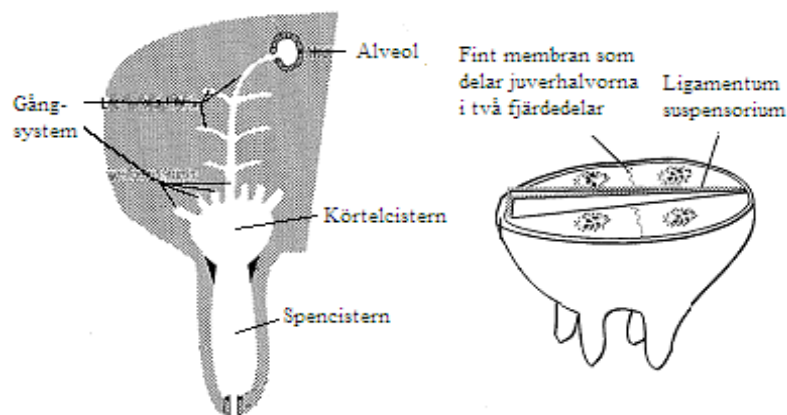
SCC är idag den vanligast använda parametern för att diagnostisera subklinisk mastit och används även, som tidigare nämnts, som betalningsgrund för mjölk som levereras till mejerierna. Är då SCC den mest optimala faktorn att analysera för att upptäcka kor med subklinisk mastit och vad säger SCC om mjölkens sammansättning? Finns det andra parametrar som ger ett säkrare resultat när det gäller att skilja ett friskt juver från ett subkliniskt inflammerat?

Syftet med denna studie var att utifrån juverhälsostatus, hos några enskilda kor, studera variationen mellan mjölkningar av ett antal inflammatoriska parametrar i mjölk och hur de förhåller sig till SCC. Dessutom studerades vissa av parametrarna i mjölkens sammansättning och relaterades till juverhälsostatus och SCC.

LITTERATURÖVERSIKT

Juveranatomi och fysiologi

Juvret är uppbyggt av alveoler, gångsystem, körtelcistern och spencistern (figur 1). Det är i alveolen som mjölken produceras och också där samt i gångsystemen som den mesta mjölken förvaras mellan mjölkningarna. Varje juverdel är att betrakta som en separat enhet även om de har viss kommunikation genom blodcirkulationen. Mellan de främre och bakre juverdelarna finns ett finare membran som tillåter mer kommunikation än mellan höger och vänster juverhalva där det finns ett kraftigare membran, ligamentum suspensorium (Tanhuanpää, 1995).



Figur 1. Översiktlig juveranatomi.

Modifierad bild enligt Tanhuanpää (1995)

Mjölk syntetiseras främst av näringsämnen som tas upp i magtarmkanalen och transporteras vidare med blodet till juvret, men triglycerider och aminosyror som mobiliseras från kroppens vävnader kan också användas (Sjaastad *et al.*, 2003). Glukos är huvudsubstrat för laktos (Kaartinen, 1995) och laktoshalten kan variera mellan 3,5 % och 5,5 % (Mantere-Alhonen, 1995). Av mjölkproteinerna är ca 80 % kasein och resten är vassle och en mindre andel blodproteiner, till exempel immunoglobuliner. De specifika mjölkproteinerna, kaseinerna, syntetiseras från aminosyror (Kaartinen, 1995).

Hos kor med friska juver har de bakre juverdelarna en signifikant högre mjölkproduktion per timme och ett högre laktosinnehåll än de främre juverdelarna (Berglund *et al.*, 2007). Proteininnehållet skiljer sig inte åt mellan främre och bakre juverdelarna. Jämför man höger och vänster juverdel inom det främre respektive bakre paret, bland mastifria juverfjärdedelar, skiljer de sig inte åt gällande mjölkproduktion per timme, protein- och laktosinnehåll (Berglund *et al.*, 2007).

Mastit

Mastit betyder inflammation i juvret. Inflammation är kroppens försvarsreaktion på till exempel en infektion men den kan också orsakas av vävnadsskada och toxiner. Mastit kan delas in i flera olika kategorier som grundas på duration (akut eller kronisk), kliniska symtom och infektion eller inte. En klinisk mastit uppvisar tydliga symtom på inflammation i juvret, med till exempel smärta och svullnad och makroskopisk förändring av mjölken. Vid subklinisk mastit finns inga makroskopiska tecken på inflammation, men mjölkens SCC är förhöjt. En infektiös mastit är orsakad av mikroorganismer medan en aseptisk mastit har andra orsaker än en infektion (Kästli, P. 1967). Det bör dock poängteras att ett negativt bakteriologiskt svar inte behöver betyda att mastiten är aseptisk. Dels ligger förhöjda celltal kvar långt efter det att infektionen försvunnit, dels har vissa bakterier en stor förmåga att gömma sig i till exempel vita blodkroppar eller mikroabcesser i juvret.

Inflammationsreaktionen och celltalet i mjölk

Inflammation är kroppens försvar på något främmande, till exempel bakterier, toxiner eller vävnadsskada. Klassiska symtom är rubor, tumor, calor, dolour och functio laesa (Sandholm, 1995a). Vid en inflammation sker en patologisk förändring i juvret med ökad blodkärlspermeabilitet, öppnade tight junctions och ökad rekrytering av vita blodkroppar till mjölken (ökat SCC) (se litteraturoversikt av Kitchen, 1981). Det här leder till förändringar i mjölken som kan användas för att diagnosticera mastit. De inkluderar, förutom leukocyter som rekryterats från blodet till mjölken, även till exempel en förändrad jonsammansättning vilket ger en ökad konduktivitet. Intracellulära enzymer, som N-acetyl- β -D-glukosaminidas (NAGase), frisätts från trasiga vävnadsceller och/eller aktiverade leukocyter och ökar vid mastit (Korhonen och Kaartinen, 1995; Sandholm, 1995a).

Inflammationsreaktionen aktiverar kroppens försvar som försöker eliminera det som är främmande. De somatiska cellerna i mjölk från kor utgörs nästan uteslutande av leukocyter (Hageltorn och Saad, 1986; Östensson 1993). I mjölk från ett friskt juver består leukocyterna till största delen av makrofager. Dessa

känner av omgivningen och utsöndrar substanser (cytokiner) som attraherar neutrofiler när de upptäcker något onormalt, till exempel mikroorganismer (Sandholm, 1995a). Neutrofilerna har förmåga att fagocytera och avdöda infektiösa ämnen och utgör det viktigaste försvaret vid mastiter (Korhonen och Sandholm, 1995). De står för den största andelen av cellökningen i mjölken vid en inflammation (Sandholm, 1995a).

Cytokiner är peptider som reglerar inflammation på flera nivåer. Vissa nedreglerar medan andra uppreglerar specifika ämnen och funktioner i kroppen som styr inflammationsreaktionen. Aktiverade makrofager, T-lymfocyter och endotelceller frisätter till exempel cytokiner som reglerar produktionen av akutfasproteiner i levern. Hos nötkreatur är de viktigaste akutfasproteinerna haptoglobin (Hp) och serum amyloid A (SAA). De ökar snabbt i blodet vid en inflammation (Sandholm, 1995a).

När kroppens försvar misslyckas med att eliminera det som är främmande kan en subklinisk mastit utvecklas och bakterierna finns kvar i juvret. Inflammationen fortgår i juvret, men en slags tolerans utvecklas då cytokiner nedreglerar inflammationsreaktionen och den ger inte längre upphov till de synliga, klassiska symtomen (Sandholm, 1995a). Ett ringgradigt inflammationssvar på grund av låg virulens hos den orsakande bakterien eller ett primärt stort immunförsvar hos kon kan också resultera i en subklinisk mastit.

SCC är i dagens läge den mest använda parametern för att upptäcka mastit. I dagligt juverhälsoarbete mäts SCC på konivå och en övre gräns på 200 000 celler/ml används som en indikator på en rimligt liten risk att kon har en *infektiös* mastit (Brolund 1985). I mjölken från en inflammationsfri juverfjärdedel är dock SCC betydligt lägre, < 100 000 celler/ml eller ännu mindre (Hillerton 1999; Hamann 2002)

Mjölksammansättning

Vid inflammation i juvret sker flera processer samtidigt som inverkar negativt på mjölkens sammansättning med försämrad kvalitet och minskad mjölmängd som följd (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981; Korhonen and Kaartinen, 1995; Sandholm, 1995b).

Vid mastit minskar produktionen av kasein och laktos (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981; Korhonen och Kaartinen, 1995; Sandholm, 1995a). Detta sker framför allt genom nedsatt sekretorisk aktivitet i juverepitelet. Den patologiska förändringen i juvret med ökad blodkärlspermeabilitet och öppnade tight junctions leder till ökat inträde av proteiner till mjölken (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981). Dessa proteiner är främst vassleproteiner och resulterar i att proteinsammansättningen förändras; kasein minskar medan vassle ökar. En ökad grad av inflammation ger ökad koncentration vassle i mjölken. Enligt Korhonen och Kaartinen (1995) förändras inte den totala mängden protein nämnvärt förrän SCC överstiger 1 000 000 celler/ml i samlingsmjölk. Det är kasein som ger mjölken den vita färgen (Mantere-Alhonen, 1995). Vid mastit minskar inte bara syntesen av kasein utan det bryts även ner av plasmin från blodet, vilket gör mjölken transparent. Nedbrutet kasein verkar proinflammatoriskt och

kemotaktiskt på granulocyter (Sandholm, 1995a). För mejeriet blir effekten, av en lägre kasein- och fettnivå, framför allt att en mindre mängd ost kan utvinnas per liter mjölk (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981).

Några utvalda humoral inflammationsparametrar

Ett flertal humoral inflammationsparametrar har analyserats i mjölk bland annat för att försöka få fram en parameter som är en mer optimal indikator på mastit än SCC. Nedan följer ett urval av en del av dessa parametrar.

Haptoglobin och serum amyloid A

Hp och SAA är de två viktigaste akutfasproteinerna hos nötkreatur, som reagerar kraftigast vid akuta mastiter (Horadagoda *et al.*, 1999; Grönlund *et al.*, 2003). Deras koncentration i serum kan stiga mer än 100 gånger (Pyörälä, 2003). Grönlund *et al.*, (2003) visade att koncentrationen av både Hp och SAA ökar i mjölk hos kor med spontan klinisk mastit och experimentellt inducerad subklinisk mastit. Det har förslagits att Hp och SAA under detektionsgränsen 0,3 µg/ml respektive 0,9 µg/ml, på juverfjärdedelsnivå, är ett tecken på god juverhälsa. Samtidigt har man observerat en stor variation av koncentrationen av Hp och SAA i juverfjärdedelar med kronisk subklinisk mastit (Grönlund *et al.*, 2005). Vid induktion av subklinisk mastit (Eckersall *et al.*, 2006) följde en ökning av Hp och SAA i den juverdelen medan övriga var opåverkade. Akutfasproteinerna i blodet/cirkulationen steg senare. Detta ger stöd för att de här akutfasproteinerna även produceras lokalt i juvret. Man upptäckte också att de juverdelar som fick två infusioner, för att öka inflammationsgraden, hade högre nivåer av Hp och SAA. Detta tyder på att SAA och Hp i mjölk kan användas som indikatorer för mastit och att de eventuellt kan indikera svårighetsgraden av tillståndet.

Laktatdehydrogenas, N-acetyl-β-D-glukosaminidas och alkalint fosfatas

NAGase är ett intracellulärt, lysosomalt enzym som utsöndras i små mängder från intakta sekretoriska celler i juvret hos friska individer (Kitchen *et al.*, 1978). Kitchen *et al.* (1978) observerade också att jämfört med blod och andra vävnader fanns NAGase i mycket större mängd i juvervävnad. Aktiviteten hos laktatdehydrogenas (LDH) och NAGase hos friska kor påverkas av antalet dagar efter kalvning och produktionsvecka. Ökad aktivitet hos parametrarna observeras vid kalvning och koncentrationen minskar därefter under 30-40 dagar (Chagunda *et al.*, 2006).

Vid en infektion ökar vävnadsskadan och permeabiliteten i membranerna i de sekretoriska cellerna vilket resulterar i en frisättning av NAGase till mjölken (Kitchen *et al.*, 1978; Zank and Schlatterer, 1998). Senare har det dock visats att NAGase frisätts främst från neutrofila granulocyter då de aktiveras eller bryts ner (se litteraturöversikt av Pyörälä, 2003). Vid en mastit när det finns ett stort antal neutrofiler i juvret utgör de den huvudsakliga källan till NAGase aktiviteten i mjölken. NAGase har visat sig vara en pålitlig inflammationsmarkör. Det finns en hög korrelation mellan NAGase och SCC i mjölk (Kitchen *et al.*, 1978; litteraturöversikt av Pyörälä, 2003).

LDH frisätts framför allt från skadade sekretoriska epitelceller i juvervävnaden men finns även i lymfocyter hos nötkreatur (Zank och Schlatterer, 1998). En högre korrelationskoefficient iaktogs mellan SCC och LDH än mellan SCC och NAGase. Detta kan förklaras med LDHs dubbla inflammationsaktivitet, det vill säga frisättningen från både epitelceller och lymfocyter. Zank och Schlatterer (1998) menar att LDH därför är en bättre mastitindikator än NAGase. Friggens *et al.* (2007) påvisade att vid användning av LDH som indikator för mastit, vid mätningar över en tid, blev fördelen att sjukdom kunde upptäckas tidigt. Det var i försöket möjligt att skilja friska kor från sjuka fyra dagar innan de behandlades för mastit av veterinär. Chagunda *et al.* (2006) visade att LDHs värden för specificitet och sensitivitet är mer stabila än värdena för NAGase, vilket indikerar att LDH är en stabilare indikator för klinisk mastit. Förmågan att identifiera friska kor var likvärdig för LDH och NAGase.

Vid mastit ökar också alkaliskt fosfatas (AP). I en studie noterades en sexfaldig ökning av AP efter infusion med endotoxin från *E. coli*. AP ökade senare och minskade långsammare jämfört med LDH (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981). En annan studie visade en ökad aktivitet av LDH och AP i fjärdedelsprover från subkliniskt infekterade juverdelar jämfört med friska juverdelar. AP hade klart bättre sensitivitet medan specificiteten var likartad för de båda parametrarna. Av det drogs slutsatsen att LDH inte är en lämplig parameter för att tidigt upptäcka subklinisk mastit medan AP har tillräckligt hög sensitivitet och tillförlitlighet för att kunna användas med det ändamålet (Babaei *et al.*, 2007). Ursprunget för AP är ej ännu fastställt (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981; Babaei *et al.*, 2007).

Laktos

Även om produktionen av laktos går ner vid mastit är procentminskningen numeriskt relativt liten och en förändring i en juverdel döljs i samlingsmjölk. Detta innebär att laktos är en ganska okänslig markör för mastit i praktiken (Sandholm, 1995b). Däremot såg Berglund *et al.* (2007), vid en jämförelse mellan juverdelarna inom juvret, en hög signifikant negativ korrelation mellan laktosinnehållet och SCC. Redan vid en moderat ökning av SCC sågs förändringar av laktoshalten. Genom att studera avvikelse av laktosinnehållet inom respektive fram- och bakfjärdedelar, kan den parametern användas för upptäckt även av moderat ökat SCC på juverdelsnivå.

Det har föreslagits att ett laktosinnehåll under 4,6 % på juverfjärdedelsnivå ska betraktas som onormalt och att man, med det kriteriet, med större säkerhet kan hitta sjukdom i juvret jämfört med SCC. Dock måste man ta hänsyn till flera olika parametrar som laktationsstadium, ålder och ras (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981). Det har också visats att laktos kan variera mycket, även hos friska individer (Mantere-Alhonen, 1995). På besättningsnivå kan det vara svårt att använda sig av laktos då låga nivåer inte alltid kan ses trots juverhälsoproblem hos > 30 % av djuren (se litteraturöversikt av Kitchen, 1981).

Variation av celltal i mjölk

Det finns en viss naturlig variation i SCC beroende på fysiologiska faktorer (se litteraturöversikt av Harmon, 1994). Den s.k. dag-till-dag variationen, utan någon synbar orsak, anses vara cirka 10% (Sjaunja, 1986). Celltalet i mjölken varierar

också beroende på laktationsstadium. Högre SCC ses under råmjölksperioden och mot slutet av laktationen. Hos kor med subklinisk mastit ses dock en kraftigare celltalsökning mot slutet av laktationen (Saloniemi, 1995). En inflammerad och/eller infekterad juverfjärdedel har generellt en högre variation av SCC än en frisk. Enligt Saloniemi (1995) påverkar inte åldern celltalet hos en frisk ko, men i praktiken har äldre kor ett ökat celltal på grund av tidigare infektioner.

En frisk ko frisätter varje dag nästan samma totala mängd celler till mjölken och en variation under dygnet beror således på en inflammation eller utspädningseffekt av mjölmängden (Sandholm, 1995b). Ett kortare mjölkningsintervall på dagen än över natten resulterar i mindre mjölmängd på kvällen än på morgonen. Vid kvällsmjölkningsen är därför cellkoncentrationen i mjölken högre än vid morgonmjölkningsen (Saloniemi, 1995). Berglund *et al.* (2004) visade att även kor med mycket lågt SCC i samlingsprovet i drygt 10 % av fallen kan ha en juverdel med inflammation och rejält förhöjda celltal, men som på grund av utspädningseffekten av mjölken från de andra tre friska juverdelarna inte upptäcks.

När juvret koloniserar av bakterier sker först en ökning av bakterier och därefter en ökning av SCC genom rekrytering av neutrofiler från blodet till juvret med syfte att oskadliggöra bakterierna (se litteraturöversikt av Kitchen 1981). Då neutrofilerna börjar avdöda bakterierna sjunker bakterieantalet vilket i sin tur kan leda till att antalet neutrofiler något senare, i alla fall tillfälligt, också kan gå ned på grund av att inflammationsstimuleringen minskar. Det ger bakterierna möjlighet att öka i antal igen vilket kräver fler neutrofiler för bakterieavdödning och rekryteringen intensifieras igen. Detta kan skapa cykliska omvända svängningar i bakterie- respektive celltal under inflammationsförloppet innan infektionen har bekämpats. De cykliska svängningarna av bakterier är inte alltid helt synkroniserade med de cykliska svängningarna av SCC (Daley *et al.*, 1991) eftersom förloppet också påverkas av många andra immunologiska faktorer.

Fram till idag är det enbart gjort ett fåtal studier på heljuvernivå där variation över tid, av främst SCC, studerats. Det har inte, av vad som kunnat läsas i litteraturen, gjorts några studier där variationen över tid studerats på juverfjärdedelnivå för de parametrar vi har analyserat i denna studie.

STUDIEN: INVERKAN AV JUVERHÄLSOSTATUS PÅ VARIATION I MJÖLKENS SAMMANSÄTTNING OCH INNEHÅLL AV UTVALDA INFLAMMATORISKA MARKÖRER

Syftet med den aktuella studien

Syftet med denna studie var att utifrån juverhälsostatus, hos några enskilda kor, studera variationen mellan mjölkningar av ett antal inflammatoriska parametrar i mjölk och hur de förhåller sig till SCC. Dessutom studerades vissa parametrar i mjölkens sammansättning och relaterades till juverhälsostatus och SCC.

Frågeställningar

- Är variationen i mjölksammansättningen respektive innehåll av inflammationsparametrar olika stor beroende på juverhälsostatus?
- Maskeras förändringar av de olika parametrarna på juverdelsnivå i olika grad i samlingsmjölken?
- Förändras någon parameter tidigare än SCC i en juverdel med mastit?
- Vad säger SCC om mjölkens sammansättning?

Material och metoder

Försöksuppläggning

Studien utfördes på Kungsängen forskningscentrum, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala och är godkänd av Uppsalas djurförsöksetiska nämnd.

Korna stod uppbundna i kortbås och utfodrades enligt svenska rekommendationer (Spörndly, 2003). De levererade mjölk till mejeriet under hela försöket och ingen behandlades för mastit.

Totalt tio kor av rasen SRB (svensk röd och vit boskap) ingick i studien. Under veckan före studien togs mjölkprov vid ett tillfälle för undersökning av bakteriologisk status per juverdel och celltal i samlingsmjölken från hela juvret. Korna valdes ut på basis av kriterierna att varje juverdel skulle vara bakteriologiskt negativ och att celltalet i samlingsmjölken skulle vara lägre än 100 000 celler/ml. Medeltalet för laktationsvecka och laktationsnummer \pm standardavvikelsen hos korna vid studiens början var $27,2 \pm 9,2$ respektive $2,2 \pm 1,8$.

Av de totalt tio korna valdes sedan tre stycken ut som representerade låga celltal (kon benämns LC), höga celltal (kon benämns HC) och höga celltal och bakteriepositiv mjölk (kon benämns HCB+). LC var i första laktationen, laktationsvecka 20 vid studiens början och hade under hela försöket låga celltal och var aldrig bakteriologiskt positiv. HC var i tredje laktationen, laktationsvecka 43 vid studiens början och var under försöket bakteriologiskt negativ, men hade höga celltal på en juverdel, höger fram (hf), genomgående under hela försöket. HCB+ var i första laktationen, laktationsvecka 34 vid studiens början och var under försöket bakteriologiskt positiv med växt av *Enterobacter cloacae* i vänster bakjuverdel (vb), och hade höga celltal. Mjölken var synligt utan anmärkning fram till sista dagen då man kunde se flockor.

Mjölkning och provinsamling

Korna mjölkades på juverfjärdedelsnivå morgon och kväll i 21 dagar i följd med ett mjölkningsintervall på 9 timmar dagtid och 15 timmar nattetid. En specialdesignad maskin från DeLaval International AB, Tumba Sweden, användes som separerade mjölken från respektive juverdel. Maskinen var av typen monovac med pulsationsförhållandet 70/30, en pulsationshastighet på 60 cykler/minut och ett systemvakuum på 42 kPa. Varje juverdelsmjölkning avslutades då mjölkflödet

per juverdel sjunkit till cirka 300 g/minut och respektive spenkopp togs av manuellt.

Mjölken från varje juverfjärdedel vägdes och mjölkprover togs. Därefter uttogs ett representativt samlingsprov på den sammanslagna mjölken från alla fyra juverdelarna. Mjölken rördes försiktigt innan proverna togs. Rören som användes för mjölkproverna var preparerade med ett konserveringsmedel, 20 w/v% bronopol, 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (VWR International AB, Stockholm, Sweden), som gav en koncentration på 0,02 % bronopol i mjölkproverna.

Mjölkprov för bakteriologisk undersökning togs varje morgon på juverfjärdedelnivå direkt efter avslutad mjölkning. Innan proven togs torkades spenarna med en fuktig juverduk och några strålar mjölk togs ur varje spene. Därefter desinficerades nedre delen av spenen och spenspetsen med 70 % sprit som tilläts torka innan proven togs i sterila mjölkkrör. Proven förvarades kylda tills bakterieodling kunde göras vilken påbörjades inom 4 timmar.

Analyser

Mjölkinnehåll och inflammationsindikatorer

Mjölkproverna analyserades med avseende på AP, Hp, LDH, NAGase, neutrofiler, SAA, SCC, kasein, laktos, totalprotein och vassle. För analys av SCC användes elektronisk fluorescencebaserad cellräkning (Fossomatic 5000, A/S N. Foss Electric, Hillerød, Danmark). Totalprotein, laktos och vassle analyserades med MIR (Mid infrared) spektroskopimetod (Fourier Transform Instrument, FT 120, Foss Electric, Danmark). Kaseininnehållet räknades ut med ledning av totalproteinet och vassle med hjälp av en indirekt kaseinbestämningsmetod där löpe faller ut kasein (Åkerstedt 2003). Kaseintalet, som anger andelen kasein i förhållande till totalproteinet, räknades ut. SAA bestämdes med hjälp av en ELISA med en detektionsnivå på 0,1 µg/ml (Mast ID RANGE Milk Amyloid A Assay, cat TP-807, Tridelta Development Ltd, Wicklow, Ireland). NAGase (EC. 3.2.1.30) analyserades med en fluorimetrisk metod (Kitchen *et al* 1978; Schüttel 1999). LDH (EC. 1.1.1.27) bestämdes med en fluorimetrisk kinetisk metod (Larsen 2005). Aktiviteten hos AP (EC 3.1.3.1) bestämdes med en fluorimetrisk kinetisk metod (Fernley and Walker, 1969). Hp analyserades, med några mindre förändringar, enligt en tidigare beskriven optisk biosensormetod (Åkerstedt *et al* 2006). Detektionsnivån var 1,0 µg/ml och bovint Hp användes för att göra standardkurvan och vid preparering av ytan (Life diagnostics, Clarkston, GA, USA). I den modifierade metoden användes 20 µg/ml Hp i 0,01 M acetatbuffert istället för 500 µg/ml Hp i 0,01 M acetatbuffert i samband med prepareringen av sensorytan. Aktiveringen av ytan minskades från sju till tre minuter. Sodium dodecyl sulphate (SDS) ökades från 2 mM till 3 mM. Efter det vanliga regenerationssteget lades ett extra steg in och 50 mM glycin, pH 9,5 injicerades över ytan under 30 sekunder. Neutrofiler räknades i utstryk av 20 mikroliter mjölk i ljusmikroskop, efter färgning med Newman, enligt IDF standard (IDF 148-1/ISO/DIS 13366-1).

Bakteriologisk odling

Mjölksproverna som togs för att påvisa eventuella bakterier odlades på eskulinagar med 5 % nötblod. Av mjölkprovet ströks 10 µl ut på plattorna som inkuberades i 37°C under 24 timmar innan första avläsningen gjordes. Alla plattor, oavsett växt eller ej vid första avläsningen, inkuberades på nytt i 24 timmar. Under första halvan av försöket skickades alla plattor med någon bakterieväxt till det bakteriologiska mastitlaboratoriet vid Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), Uppsala, för bakterieartbestämning, enligt protokollet för kvalitetsförsäkringen SS-EN ISO/IEC 17025. Under andra halvan av försöket avlästes de plattor från ko HCB+ som hade växt av *Enterobacter cloacae* i renkultur, utan medverkan av SVA.

Statistisk analys

Analysen av statistisk data gjordes med SAS (version 9.1 SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) och PROC NESTED. I denna studie valdes ko, juverfjärdedel och mjölkning ut som fixa faktorer och användes enligt formeln:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \omega_{ijk} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = den $ijkl$:te observationer av varje egenskap

μ = medelvärde

α_i = effekten av den i :te kon

β_{ij} = effekten av den j :te juverfjärdedelen inom den i :te kon

ω_{ijk} = effekten av den k :te mjölkningen inom den j :te juverfjärdedelen inom den i :te kon

e_{ijkl} = restterm

Vid analys av alla tio kor respektive nio kor användes formeln som beskrivs ovan. När vi analyserade varje enskild ko användes inte effekten av ko utan enbart effekten av juverfjärdedel och mjölkning.

Den sista parametern, e , är den varians som inte kan förklaras av de valda parametrarna i metoden. Det vill säga e är, hos den enskilda kon, variansen mellan mjölkningarna som inte beror på juverfjärdedel och intervallet mellan mjölkningarna.

S_e = standardavvikelsen

X = medelvärde

CV = variationskoefficient (%)

$$CV = (S_e/X) \cdot 100$$

CV (%) är den variation mellan mjölkningarna som, i gruppen på 10 respektive 9 kor, inte kan förklaras av ko, juverdel eller mjölkning och som hos den enskilde

individen inte kan förklaras av juverdel eller mjölkning. Det är variationen som finns mellan mjölkningarna hos friska kor och som hos kor med mastit påverkas av dess sjukdom och förändras.

SCC logaritmerades då denna parameter hos en sjuk ko inte är normalfördelad.

För att säkerställa de statistiska resultaten användes även GLM. Denna metod gav samma resultat som PROC NESTED.

Resultat

Efter den statistiska bearbetningen jämförs resultat, i tabell 1, från hela gruppen på 10 kor med resultat från enbart de bakteriologiskt negativa korna i gruppen, det vill säga ko HCB+ är borttagen. Där kan tydligt ses att CV (%), variationen, är olika i gruppen på 10 kor jämfört med bland de 9 korna.

Tabell 1. Ett urval av de analyserade parametrarna på juverfjärdedelsnivå och i samlingsmjölk för gruppen på 10 kor respektive enbart de bakteriologiskt negativa korna i gruppen (ko höga celltal och bakteriologiskt positiv är borttagen). Medelvärde \pm standardavvikelse och CV (%) redovisas, där CV (%) är den variation mellan mjölkningarna som inte kan förklaras av ko, juverfjärdedel eller mjölkning

Parameter	Fjärdedelmjölk		Samlingsmjölk	
	Alla kor	9 kor	Alla kor	9 kor
Laktatdehydrogenas (U/l)	3,4 \pm 11,4	2,4 \pm 0,7	3,0 \pm 3,2	2,4 \pm 0,7
CV (%)	270	8	77	11
N-acetyl- β -D-glukosaminidas (U/l)	3,1 \pm 5,9	2,6 \pm 1,7	3,1 \pm 2,5	2,7 \pm 1,8
CV (%)	149	22	50	17
Serum amyloid A (μ g/ml)	9,2 \pm 89,7	0,8 \pm 1,5	2,25 \pm 8,6	0,55 \pm 1,0
CV (%)	761	50	283	32
Kaseintal	0,73 \pm 0,02	0,73 \pm 0,01	0,73 \pm 0,01	0,73 \pm 0,01
CV (%)	2,6	0,9	1,0	0,8
Vassle (%)	0,94 \pm 0,13	0,94 \pm 0,08	0,94 \pm 0,09	0,94 \pm 0,09
CV (%)	9,7	2,5	3	2,4

Jämför man de tre utvalda kornas medelvärde av CV (%) på juverfjärdedelsnivå ser man i tabell 2 att HCB+ har högre CV (%) gällande alla analyserade parametrar; AP, Hp, LDH, log SCC, NAGase, SAA, kasein, kaseintal, laktos, protein och vassle. Jämför man kornas CV (%) på juverfjärdedelsnivå, tabell 3, med varandra visar de att HCB+ vb är den som har högst CV (%) av alla juverdelar och alla parametrar. Det är också den juverdel som är bakteriologisk positiv.

Tabell 2. De analyserade parametrarnas CV (%) hos de tre korna; LC (lågt celltal), HC (högt celltal) och HCB+ (högt celltal och bakteriologiskt positiv). CV (%) är variationen mellan mjölkningarna som inte beror på juverdel och mjölkning

Parameter	Medeltalet för CV (%) i juverfjärdedelsmjölk		
	LC	HC	HCB+
Alkalint fosfatas	21	21	36
Laktatdehydrogenas	20	21	234
Log SCC	3	2	7
N-acetyl- β -D-glukosaminidas	14	12	198
Serum amyloid A	17	97	276
Kasein	2	2	8
Kaseintal	1	1	8
Laktos	1	1	4
Protein	2	2	5
Vassle	2	3	29

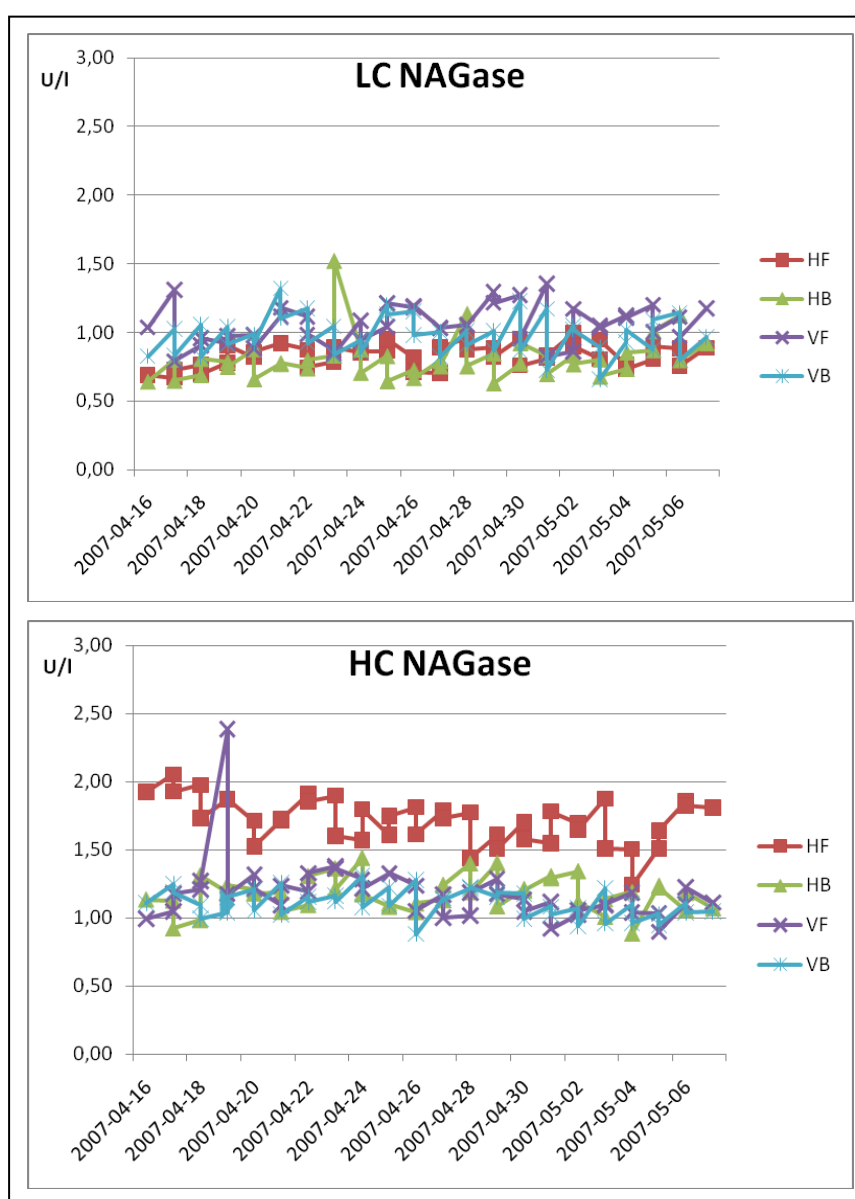
Tabell 3. De analyserade parametrarnas CV (%) i fjärdedelsmjölk från utvalda juverdelar hos de tre korna; LC (lågt celltal alla juverdelar), HC (högt celltal hf) och HCB+ (högt celltal hf och vb och bakteriologiskt positiv vb). CV (%) är variationen mellan mjölkningarna som inte beror på juverdel och mjölkning

Parameter	CV (%) per juverfjärdedel			
	LC hf	HC hf	HCB+ hf	HCB+ vb
Alkalint fosfatas	19	16	18	53
Laktatdehydrogenas	19	21	21	131
Log SCC	3	1	4	10
N-acetyl- β -D-glukosaminidas	10	10	10	116
Serum amyloid A	11	41	46	138
Kasein	2	3	3	16
Kaseintal	1	1	1	17
Laktos	1	1	1	8
Protein	2	2	3	9
Vassle	2	3	4	45

Rådata från de enskilda korna

Figurerna under denna rubrik baseras på rådata från analyserna och ger en bild av hur värdena hos varje ko *faktiskt* varierar mellan mjölkningarna och under studiens tre veckor. Till skillnad från CV (%) har man inte tagit hänsyn till mjölkning och juverfjärdedel, vilket gör att variationen i diagrammen för rådata och CV (%) kan se olika ut. Det kan också noteras att ”taggigheten” i kurvorna för de friska juverdelarna medförs av att proverna tagits vid både morgon- och kvällsmjölkning då det är välkänt att mjölkens innehåll av olika faktorer ligger på olika nivåer. Sannolikt beror detta på det skeva mjölkningsintervallet under dag respektive natt som i denna studie var på 9 respektive 15 timmar.

Figur 2 visar som ett exempel analys av NAGase för korna LC och HC. LC har en något högre CV (%) än HC för NAGase, men HC har i hf, den subkliniskt inflammerade juverdelen, högre koncentration än i de tre resterande juverdelarna.

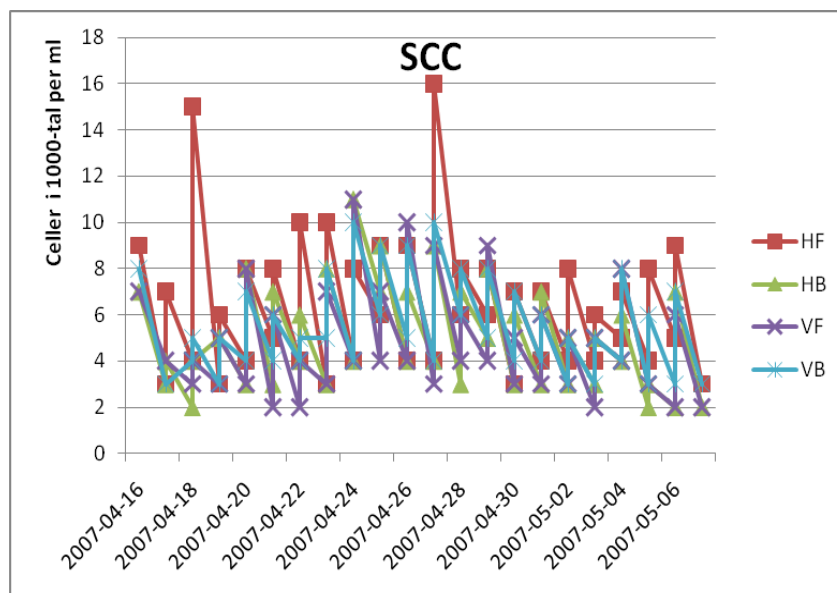


Figur 2. Koncentrationen av N-acetyl- β -D-glukosaminidas (NAGase) i fjärdedelsmjölk, under försöket, hos korna LC (lång celltal) och HC (hög celltal i hf).

Ko med låga celltal (LC)

Här visas som exempel data avseende SCC (Figur 3) samt LDH och laktos (Figur 4).

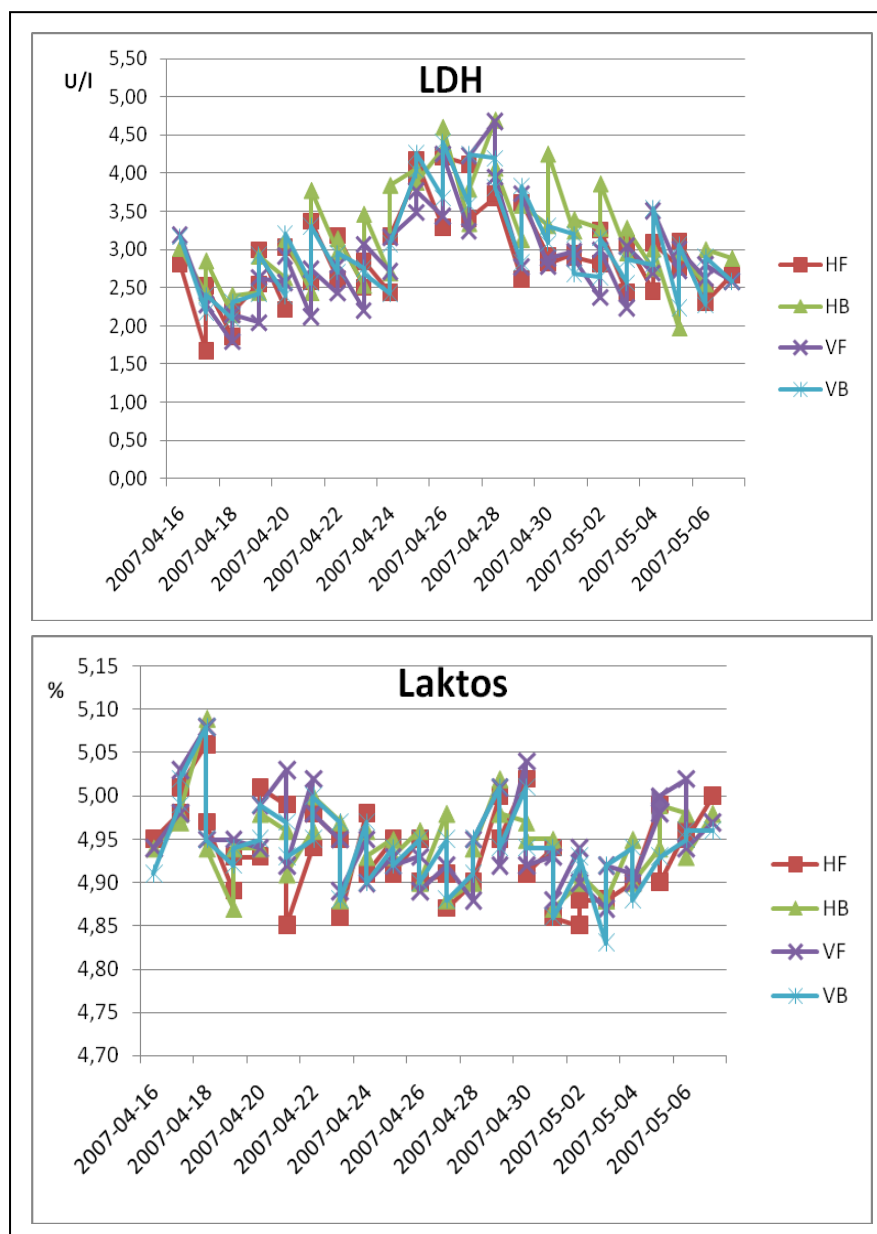
SCC varierar på de enskilda juverdelarna mellan 2 000 och 16 000 celler/ml med ett medelvärde på 5 000 celler/ml.



Figur 3. Somatic cell count (SCC) i fjärdedelsmjölk hos ko LC (låga celltal).

För de analyserade parametrarna AP, LDH, NAGase och SAA ligger de i alla juverdelar inom samma intervall och följer varandra väl med samma mönster. AP har ett medelvärde på 547,8 U/l och varierar mellan 306,9 U/l och 872,1 U/l. LDH har ett medelvärde på 3,03 U/l och varierar mellan 1,67 U/l och 4,70 U/l. NAGase har ett medelvärde på 0,92 U/l och varierar mellan 0,63 U/l och 1,52 U/l. SAA har ett medelvärde på 0,22 µg/ml och varierar mellan 0,13 µg/ml och 0,35 µg/ml. Parametern Hp låg i alla juverdelar under detektionsnivå på 1 µg/ml försöket igenom.

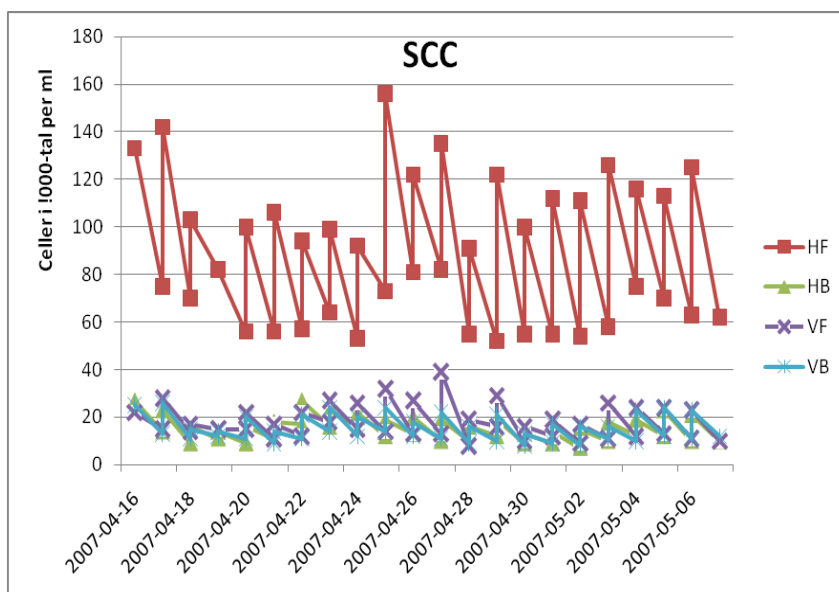
Alla juverdelar följer varandra väl för de analyserade parametrarna kasein, kaseintal, laktos och vassle. Laktos har ett medelvärde på 4,94 % och varierar mellan 4,83 % och 5,09 %. Kasein har ett medelvärde på 2,41 % och varierar mellan 2,23 % och 2,60 %. Kaseintalet har ett medelvärde på 0,73 och varierar mellan 0,72 och 0,75. Vassle har ett medelvärde på 0,88 % och varierar mellan 0,83 % och 0,94 %.



Figur 4. Koncentrationen av laktatdehydrogenas (LDH) och laktos i juverdelsmjök hos ko LC (lågt celltal).

Ko med höga celltal i hf (HC)

Här visas som exempel data avseende SCC (Figur 5) samt SAA och laktos (Figur 6). SCC i hf varierar mellan 52 000 och 156 000 celler/ml med ett medelvärde på 89 000 celler/ml. Resterande juverdelar varierar mellan 7 000 och 39 000 celler/ml med ett medelvärde på 16 000 celler/ml. Jämför man juverdelarna och medeltalen för SCC så har hf ett drygt 5,5 gånger så högt SCC som resterande juverdelar. Se figur 5.



Figur 5. Somatic cell count (SCC) i juverdelsmjölks hos ko HC (höga celltal).

Då det gäller AP följer juverdelarna varandra väl. Ett värde, på 836,3 U/l, i vf vid morgonmjölkningen 19/4 är högre än övriga värden. Medelvärde för alla juverdelar är 338,5 U/l. Resterande juverdelar och mjölkningar, förutom vf 19/4, varierar mellan 167,8 U/l och 578,1 U/l.

Hp-koncentrationerna är under detektionsnivån, 1 µg/ml, för alla juverdelar försöket igenom.

LDH har något högre värden i hf, 3,18 U/l i medelvärde jämfört med 2,43 U/l i medelvärde för de övriga juverdelar. Variationen i hf är 1,97–5,50 U/l, i resterande juverdelar varierar LDH mellan 1,46 U/l och 4,44 U/l. LDH-värdena i respektive juverdel följer dock samma mönster.

NAGase har högre medelvärden i hf, 1,71 U/l, jämfört med övriga juverdelar som har ett medelvärde på 1,16 U/l. NAGase varierar i hf mellan 1,24 U/l och 2,05 U/l. Resterande juverdelar varierar mindre, mellan 0,88 U/l och 1,44 U/l, förutom ett högre värde i vf på 2,39 U/l, morgonmjölkningen 19/4. Värdena i juverdelarna, utom hf, följer varandra väl. Se figur 2.

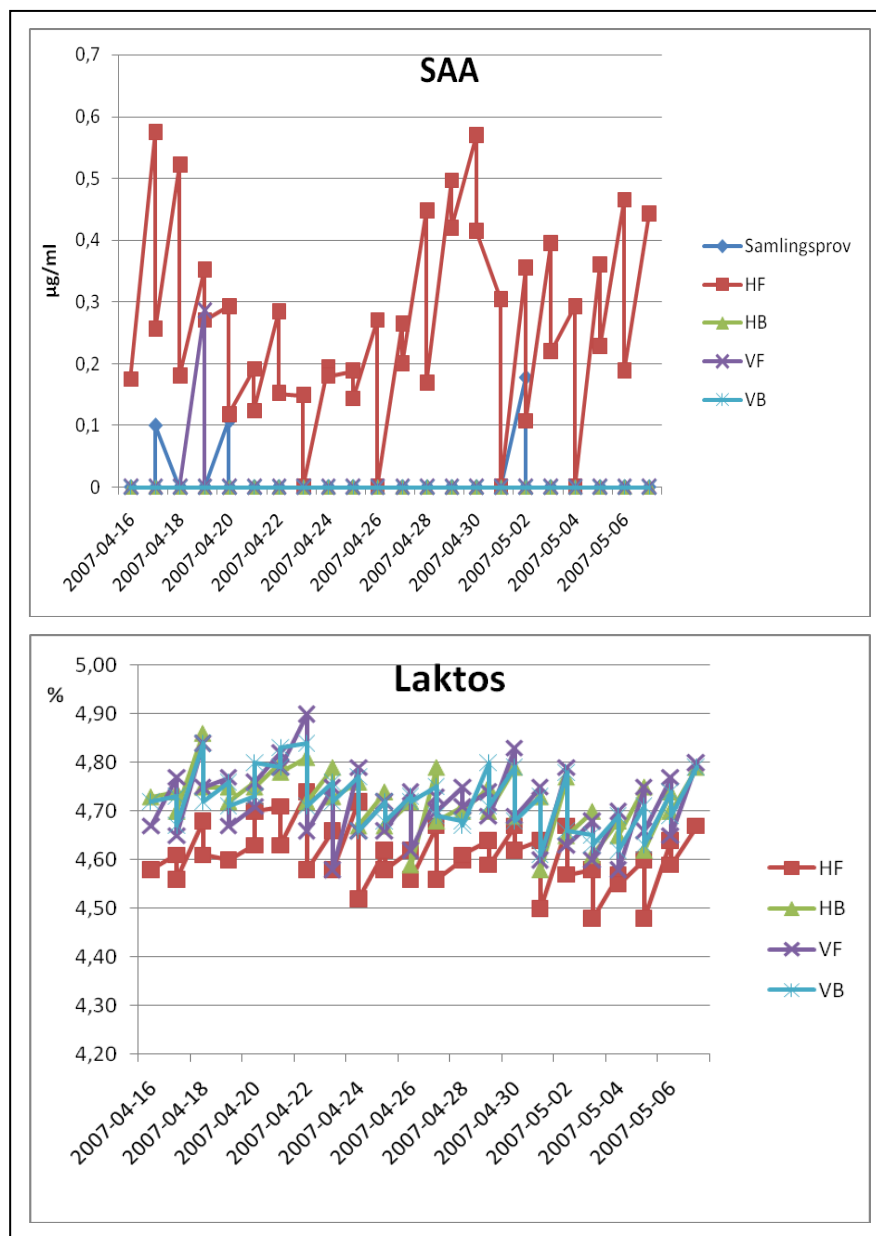
SAA är detekterbart i hf försöket igenom. Bara enstaka värden är under detektionsnivån 0,1 µg/ml. Medelvärdet är 0,26 µg/ml för hf och varierar mellan under analysmetodens detektionsnivå och 0,57 µg/ml. Vid ett tillfälle är SAA förhöjt även i vf och i samlingsprovet vid tre tillfällen. Övriga värden är lägre än detektionsnivån. Se figur 6.

Angående kasein, kaseintal och vassle följer juverdelarna varandra väl. Kasein har medelvärde på 2,85 % och varierar mellan 2,57 % och 3,09 %. Medelvärdet för

kaseintalet är 0,74 och varierar mellan 0,72 och 0,76. Vassles medelvärde är 1,03 % och varierar mellan 0,93 % och 1,10 %.

Laktos har ett något lägre medelvärde i hf, 4,61 %, jämfört med 4,72 % i medelvärde för samtliga övriga juverdelar. Variationen i hf är 4,48–4,74 % och för samtliga övriga juverdelar är den 4,58–4,90 %. Alla juverdelarna följer samma mönster. Se figur 6.

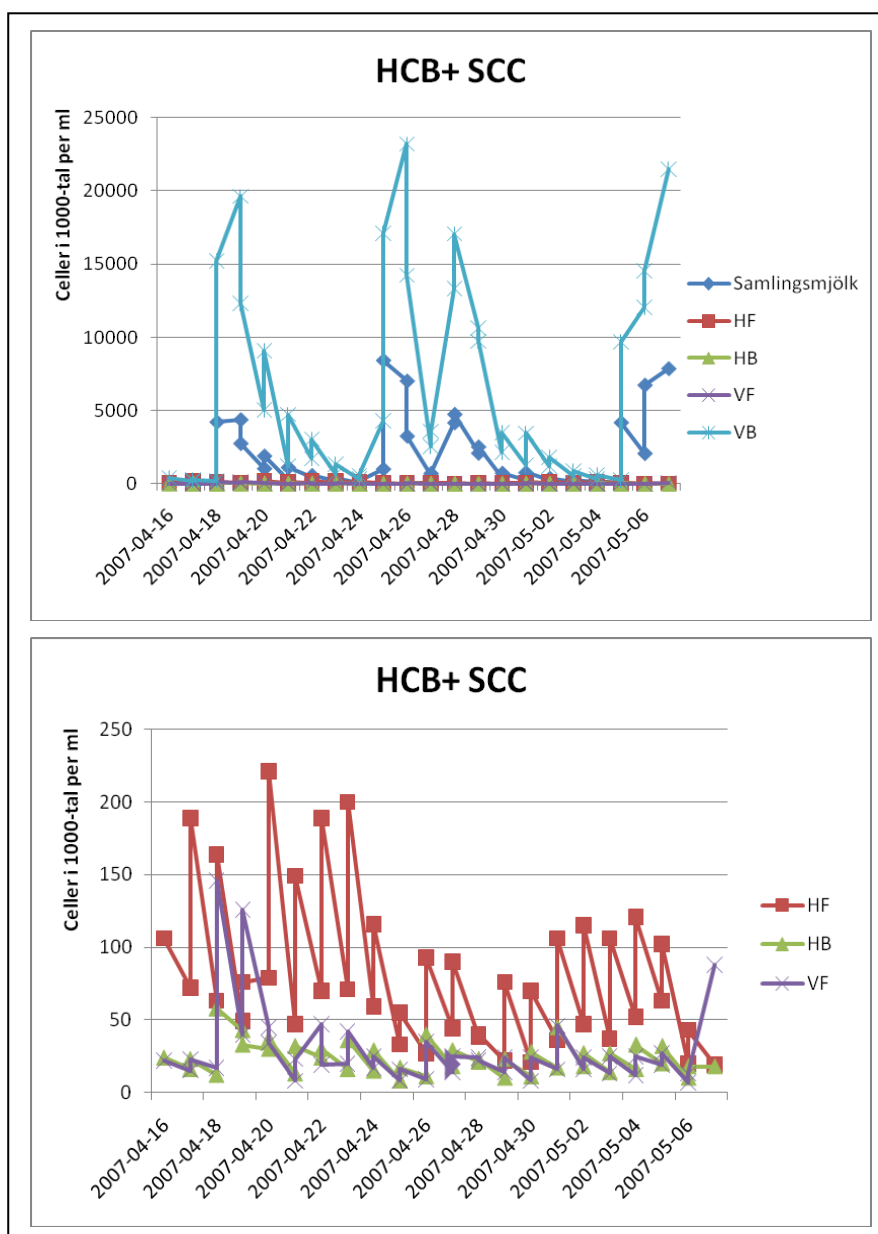
Sammanfattningsvis ses en förändring i hf på parametrarna LDH, NAGase, SAA och SCC. Ett högre värde för vf kan ses morgonmjölkningen 19/4 för parametrarna AP, NAGase, SAA, och eventuellt LDH.



Figur 6. Koncentrationen av serum amyloid A (SAA) och laktos i juverdelsmjölk samt SAA även i samlingsmjölk hos ko HC (höga celltal).

Ko med höga celltal i hf och vb och bakteriologiskt positiv i vb (HCB+)

SCC i vb varierar mellan 226 000 och 23 197 000 celler/ml med ett medelvärde på 5 957 000 celler/ml. SCC i hf varierar mellan 19 000 och 221 000 celler/ml med ett medelvärde på 81 000 celler/ml. SCC i vf och hb varierar mellan 7 000 och 146 000 celler/ml med endast enstaka värden över 50 000 celler/ml. Medelvärdet är, för hb och vf tillsammans, 27 000 celler/ml. Se figur 7.

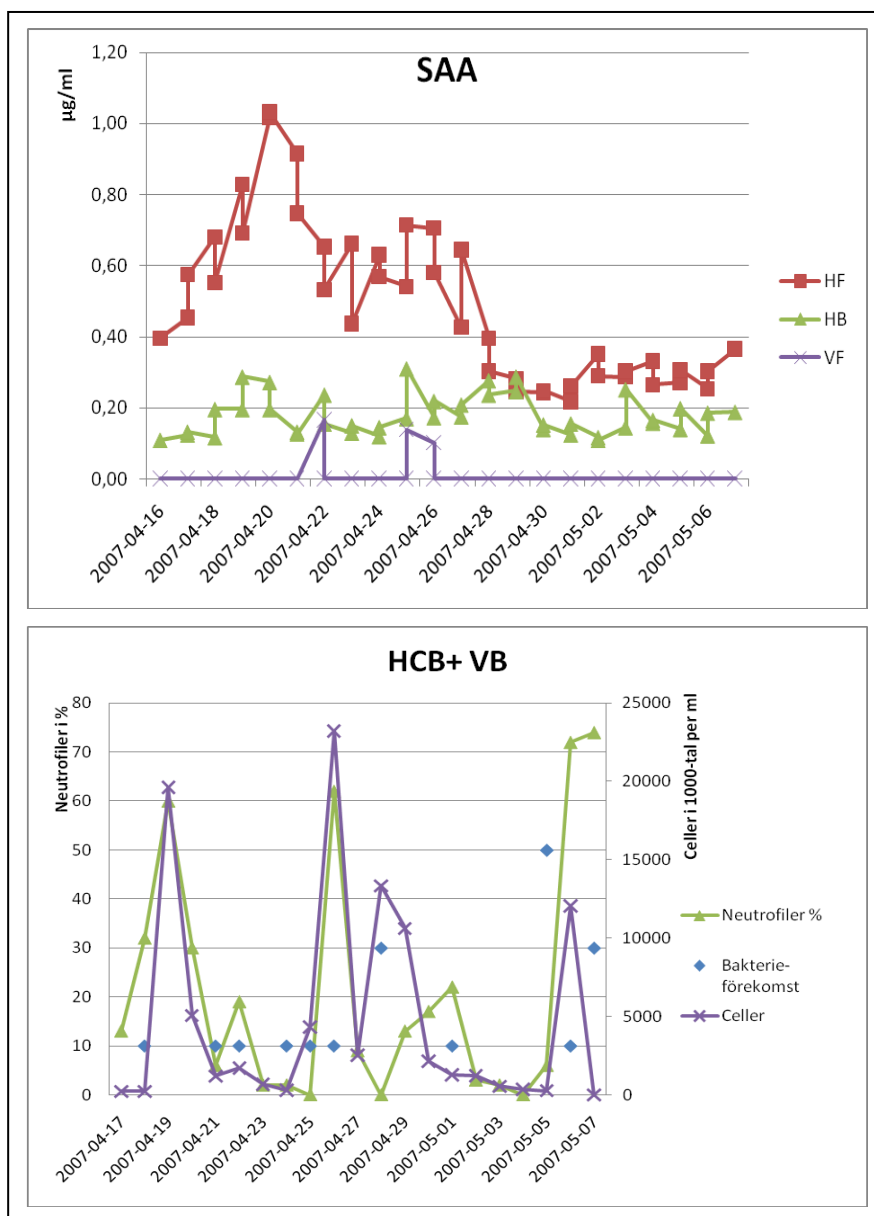


Figur 7. Somatic cell count (SCC) i juverdelsmjölk samt samlingsmjölk hos ko HCB+ (höga celltal och bakteriologiskt positiv). Det undre diagrammet utgör en förstoring av det övre.

Figur 8 visar SCC, neutrofiler och bakterieförekomsten under försöket hos ko HCB+. Vid 11 av de 21 bakteriologiska provtagningar växer *Enterobacter cloacae* i renkultur. Tre nivåer av bakterieförekomst redovisas; lindrig, måttlig

och riklig. Riklig bakterieväxt observerades vid ett tillfälle och måttlig bakterieväxt vid två tillfällen. De resterande 8 positiva proverna visade lindrig växt. Neutrofilförekomsten är cyklisk och synkroniserad med de kraftiga celltalstopparna i vb tre av fyra gånger. Vid celltalstopp nummer tre ses en fördröjning av neutrofiltoppen.

SAA i vb har ett medelvärde på 336,4 µg/ml och variationen är 2,3 -1 488,0 µg/ml. Medelvärdet för hf är 0,49 µg/ml med en variation mellan 0,22 µg/ml och 1,03 µg/ml. Resterande två juverdelar tillsammans har ett medelvärde på 0,09 µg/ml och varierar mellan under analysmetodens detektionsnivå och 0,31 µg/ml.

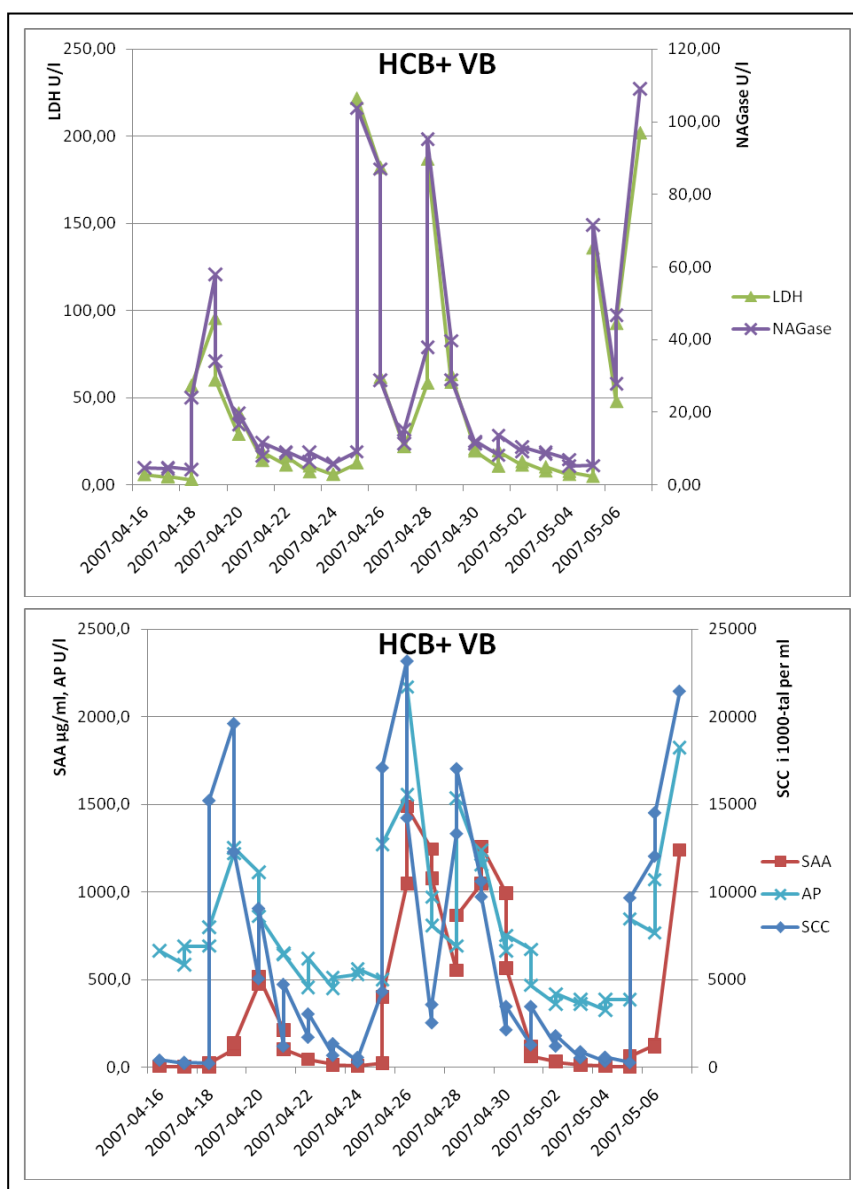


Figur 8. I det övre diagrammet visas koncentrationen av serum amyloid A (SAA) i juverdelsmjolk hos ko HCB+ (höga celler och bakteriologiskt positiv). Det undre diagrammet visar parametrarna neutrofiler, bakterieförekomst och celltal i enbart den infekterade vänster bakjuverdelen (VB) hos samma ko. Bakterieförekomsten är utmärkt på tre nivåer; lindrig <10 kolonier, måttlig 10-50 kolonier och kraftig >50 kolonier.

AP i vb har ett medelvärde på 807,0 U/l med en variation mellan 325,5 U/l och 2 170,4 U/l. Medelvärdet för övriga tre juverdelar tillsammans är 570,2 U/l med en variation mellan 264,3 U/l och 950,4 U/l. De följer varandra väl efter med AP-värden som uppvisar samma mönster.

Hp i vb har ett medelvärde på 10,3 ug/ml med en variation på <1-35 ug/ml. I resterande juverdelar är Hp under detektionsgränsen på 1 ug/ml.

LDH i vb har ett medelvärde på 44,97 U/l och en variation mellan 2,98 U/l och 221,80 U/l. Medelvärdet i hf är 1,96 U/l med en variation mellan 1,09 U/l och 3,04 U/l. Resterande två juverdelar har tillsammans ett medelvärde på 1,64 U/l med en variation mellan 0,73 U/l och 2,83 U/l. I juverdelarna hf, vf och vb följer LDH-värdena samma mönster.



Figur 9. Koncentrationen av alkalint fosfatas (AP), laktatdehydrogenas (LDH), N-acetyl- β -D-glucosaminidas (NAGase), serum amyloid A (SAA), och somatic cell count (SCC) i den infekterade vänster bakjuverdelen hos ko HCB+ (höga celler och bakteriologiskt positiv).

NAGase i vb har ett medelvärde på 24,95 U/l med en variation mellan 4,20 U/l och 109,15 U/l. Resterande tre juverdelar har tillsammans ett medelvärde på 1,43 U/l med en variation mellan 1,09 U/l och 1,77 U/l och följer varandra väl med NAGase-värden som visar samma mönster.

AP, Hp, LDH, NAGase och SAA i vb följer celltalstopparna i samma juverdel. SAA har en viss fördröjning, det vill säga att toppen kommer något senare än de övriga parametrarnas toppar.

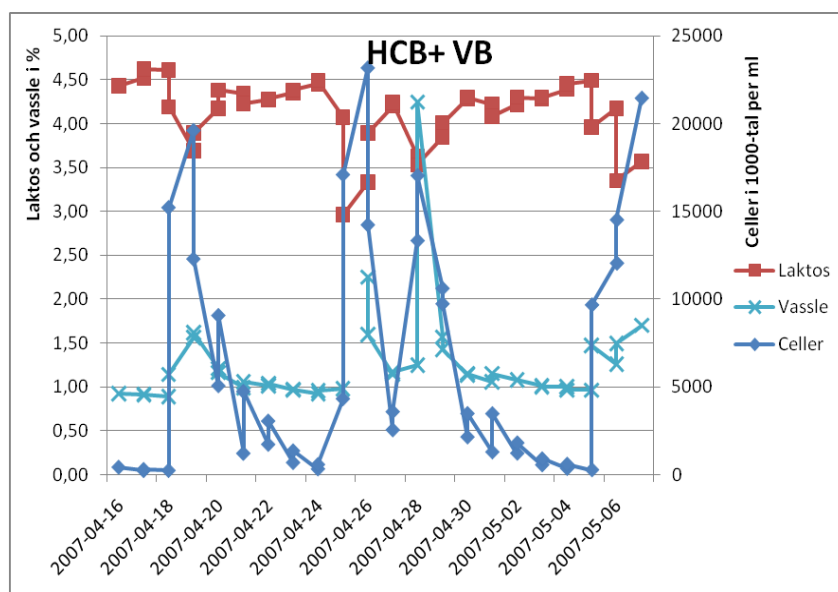
Kasein, kaseintal och laktos i vb följer celltalstopparna i samma juverdel med *minskade* värden. Vassle vb följer också celltalstopparna men med ökade värden. Kasein, kaseintal, laktos respektive vassle i övriga juverdelar följer varandra väl.

Kasein i vb har ett medelvärde på 2,50 % med en variation mellan 0,24 % och 2,80 %. Resterande tre juverdelar har tillsammans ett medelvärde på 2,59 %. Ett värde i hb är lägre än övriga värden, 0,61 %, medan resterande värden har en variation mellan 2,37 % och 2,84 %.

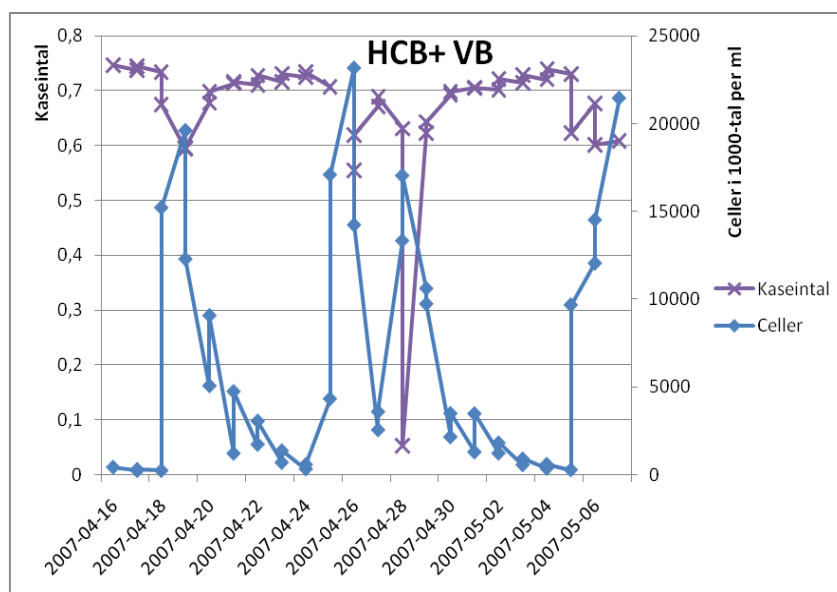
Kaseintalet i vb har ett medelvärde på 0,67 med en variation mellan 0,05 och 0,74. Resterande juverdelar har ett medelvärde på 0,75. Ett värde i hb är lägre än övriga, 0,17, medan resterande värden har en variation mellan 0,73 och 0,77.

Laktos i vb har ett medelvärde på 4,13 % med en variation mellan 2,96 % och 4,62 %. Resterande tre juverdelar har tillsammans ett medelvärde på 4,59 % och en variation mellan 4,40 % och 4,80 %.

Vassle i vb har ett medelvärde på 1,25 % med en variation mellan 0,89 % och 4,24 %. Resterande juverdelar har ett medelvärde på 0,88 %. Ett värde i hb är högre än övriga, 2,98 %, resterande värden varierar mellan 0,78 % och 0,95 %.



Figur10 . Koncentrationen av somatic cell count (SCC), laktos och vassle i den infekterade vänster bakjuverdelen hos ko HCB+ (höga celltal och bakteriologiskt positiv).



Figur 11. Somatic cell count (SCC) och kaseintal i den infekterade vänster bakjuverdelen hos ko HCB+ (höga celltal och bakteriologiskt positiv).

Hur förändras parametrarna i samlingsproven i förhållande till juverfjärdedelsproven?

AP – I samlingsprovet från HCB+ är AP kraftigt förhöjt vid ett tillfälle i samband med en celltalstopp i vb och i viss mån ses en ökning även vid en annan celltalstopp (den sista). I övrigt ses inga tydliga ökningar. AP-koncentrationen i samlingsproven från HC och LC följer värdena på juverdelnivå.

Hp – I samlingsprovet från HCB+ följer Hp-värdena celltalstopparna i vb. I samlingsproverna från LC och HC är Hp i samtliga prov under detektionsnivån, 1 ug/ml.

LDH – I samlingsprovet från HCB+ följer LDH-koncentrationen celltalsförändringarna i vb med enstaka värden på lika låg nivå som i övriga juverdelar. LDH i samlingsmjölken från korna LC och HC följer väl nivån på juverdelnivå.

NAGase – I samlingsprovet från HCB+ är NAGase förhöjt hela försökstiden och värdena varierar mellan 2,09 U/l och 21,55 U/l; det följer celltalsförändringarna i vb. I samlingsprovet från HC är inte NAGase förhöjt, trots att värdena i hf var höga, utan följer nivåerna i övriga juverdelar med värden mellan 0,79 U/l och 1,35 U/l. I samlingsmjölken från LC följer NAGase nivåerna i respektive juverdel väl med värden mellan 0,77 U/l och 1,75 U/l.

SAA – I samlingsprovet för HCB+ är SAA förhöjt alla dagar och följer celltalsförändringarna i vb. SAA varierar mellan 0,91 µg/ml och 255,6 µg/ml. I samlingsmjölken från HC ger SAA bara utslag två dagar och då med låga värden

på 0,1 µg/ml och 0,18 µg/ml, trots att värdena i hf var förhöjda betydligt oftare. I samlingsprovet från LC är värdena lägre än i respektive juverdel.

SCC – I samlingsprovet för HCB+ ökar SCC och följer celltalsförändringarna i vb. SCC varierar mellan 78 000 och 8 446 000 celler/ml. I samlingsmjölken från HC är medelvärdet för den totala tiden dubbelt så högt som det samlade medelvärdet för hb, vf och vb. För LC följer SCC i samlingsprovet respektive juverdel väl och varierar mellan 3 000 och 11 000 celler/ml med ett medelvärde på 5 000 celler/ml.

Kasein – I samlingsprovet från HCB+ avspeglas inte kaseinsvängningarna i vb, utan följer övriga juverdelar väl. Kasein i samlingsmjölken från HC och LC följer värdena på juverdelsnivå.

Kaseintal – I samlingsprovet från HCB+ ses små negativa utslag i kaseintal i samband med celltalstopparna i vb. Kaseintalet i samlingsmjölken från både HC och LC följer juverdelsnivån väl.

Laktos – Laktos i samlingsprovet från HCB+ följer omvänt celltalstopparna i vb, men utan stora förändringar. I samlingsmjölken från HC är inte laktoshalten förändrad, trots de lägre värdena i hf, utan följer koncentrationen i övriga juverdelar väl. Detsamma gäller laktos i samlingsmjölken från LC.

Vassle – Vassle i samlingsprovet för HCB+ ökar i samband med celltalstopparna i vb. För HC och LC följer vasslehalten i samlingsprovet halten på juverdelsnivå väl.

Diskussion

Är variationen i mjölksammansättningen respektive innehåll av inflammationsparametrar olika stor beroende på juverstatus?

Det finns indikationer på att en ko med en inflammationsreaktion i juvret har en högre CV (%) då det gäller SCC (Saloniemi, 1995). Det vill säga att SCC varierar mer, än hos en ko som är frisk i juvret. I vår studie stämmer inte det helt och hållet. Ko HCB+, med kraftigt subklinisk inflammation med infektion i vb, hade högre CV (%) för alla analyserade parametrar, men inte korna HC i hf och HCB+ i hf, båda med ringgradig subklinisk inflammation. Finns det en grad av subklinisk inflammation som kor måste komma upp i innan man kan se en ökad CV (%) generellt då det gäller flertalet parametrar? Eller krävs det en infektion för att förändra CV (%)? HCB+ hade en stark inverkan på medelvärdet för hela ko-gruppens CV (%) för flertalet parametrar. Det blev en betydande skillnad i variationen för alla parametrar beroende på om HCB+ räknades med eller om beräkningarna gjordes enbart på de nio bakteriologiskt negativa korna. Det är lätt att förstå att en ko med mastit kan ha stor påverkan på tankmjölken. Slutsatsen i denna studie är att det är en skillnad i variation mellan en ko med kraftig subklinisk inflammation med infektion och en ko med ett mastitfritt juver.

Det är viktigt att tänka på att CV (%) inte säger något om vilken koncentration parametern har i mjölken. En juverdel som har hög koncentration av en parameter, men inte varierar i koncentration kan få lägre CV (%) än en juverdel som har låg koncentration, men varierar mer. Detta såg vi i jämförelsen av NAGase mellan ko LC och HC.

Att inflammationsparametrarna i vb hos HCB+ så enhetligt reagerade med toppar vid vissa tillfällen är ett tecken på ett ökat inflammationsstimuli och en tillfälligt ökad inflammationsgrad, som sannolikt främst orsakats av bakterieinfektionens dynamik med förökning respektive avdödning.

I vf (lågt SCC) hos ko HC ses i provet från morgonmjölkningen den 19/4 en topp avseende ett flertal parametrar som säkert inte beror på slumpen utan på en kortvarig inflammationsreaktion. Även om det inte fanns en uppenbar orsak har juvret sannolikt utsatts för något som det reagerat på, såsom ett mindre trauma eller mikroorganismer som kommit in i juvret men snabbt avlägsnats innan de etablerat en infektion. En felanalys är inte trolig och skulle inte gett genomslag på flera parametrar med olika analysmetoder.

Att samlingsprovet för SAA från ko LC visar lägre värden än respektive juverdel kan förklaras med att provet är analyserat med andra samlingsprov och inte tillsammans med juverdelsproverna, vilket kan ha inverkat på resultatet.

Maskeras förändringar av de olika parametrarna på juverdelsnivå i olika grad i samlingsmjölken?

I samlingsproven från ko HCB+ var flera parametrar påtagligt förändrade i jämförelse med juverdelarna med lågt SCC. Detta räcker dock inte alltid för att hitta en ko med mastit. Att man behöver analysera oftare än vad man vanligtvis idag gör visade resultaten från ko HCB+ tydligt. Hon hade emellanåt ett kraftigt ökat SCC, upp till dryga 23 000 000 celler/ml i vb och samtidigt 8 400 000 celler/ml i samlingsprover. Dessutom var en del samlingsprover så låga som 78 000 celler/ml och vår egen provmjölkning veckan innan visade 53 000 celler/ml i samlingsprovet. Detta gör att man inser att med analys av SCC, vid ett enda provtagningstillfälle, är det svårt att få en rättvis bild av en kos juverhälsa och kunna säga att juvret är friskt eller inflammerat. Det här är en viss svaghet i ko-kontrollens provmjölkning som sker en gång per månad, men där styrkan är att den upprepas regelbundet och SCC kan följas under lång tid.

Det är ännu svårare att identifiera kor med måttlig subklinisk inflammation om man bara fokuserar på koncentrationen celler och framför allt vid användning av bara samlingsmjölk. Ett samlingsprov med 100 000 celler/ml säger inte alltid att kon har ett friskt juver. För det första blir det en utspädningseffekt i samlingsprovet. En juverdel kan ha kraftigt förhöjt SCC och samlingsmjölken kan ändå hamna under 100 000 celler/ml om bara de andra juverdelarna har låga SCC (Berglund *et al.*, 2004). För det andra kan en juverdel vara ringgradigt subkliniskt inflammerad även om dess SCC inte överstiger 100 000 celler/ml. För att bättre upptäcka mindre celltalsförändringar kan man jämföra alla fyra juverdelar och se om någon avviker från de andra (Berglund *et al.*, 2007). Ett mått på en onormal avvikelse som användes av Berglund *et al.* (2007) var en cirka 2 gånger ökning

jämfört med övriga juverdelar. Problematiken med utspädning i samlingsprovet av mjölk från en juverdel med ett avvikande, förhöjt SCC kunde vi observera på ko HC. Hon hade ett medeltal för SCC i samlingsprovet på 30 000 celler/ml, vilket talade för att juvret var friskt. Jämförde man hf, den subkliniskt inflammerade juverdelen, med övriga såg man att medeltalet för SCC i hf var drygt 5,5 gånger så stort som övriga juverdelar. Detta, samt att kon flera gånger under försöket hade SCC som låg över 100 000 celler/ml i hf, tydde på att juverdelen hade en subklinisk inflammation. Det är för lantbrukaren viktigt att vara medveten om detta. Att om celltalet hos en ko vid provmjölkningen har ökat från exempelvis 20 000 till 40 000 celler/ml kan en juverdel med betydligt högre SCC, mastit och eventuell infektion döljas.

På liknade sätt som för SCC maskeras förändringar i hf för flera andra analyserade parametrar i samlingsmjölken från ko HC. Förändringarna på juverdelsnivå av de olika parametrarna i denna studie ger dock inte indikation på att maskeras i olika grad i samlingsmjölken.

Förändras någon parameter tidigare än SCC vid mastit?

Celltalet har använts i flera decennier för att diagnosticera mastit, men är det den mest optimala och mest fördelaktiga diagnostiska metoden? Är det den parameter som fortfarande står sig bäst och den vi ska hålla fast vid? Resultaten i denna studie visade att för HCB+, med en kraftig subklinisk inflammation och infektion i vb, fungerade flera parametrar bra för att diagnostisera mastiten. Alla parametrar, förutom kasein, var tydligt förändrade för den infekterade juverdelen och det var inte svårt att se skillnad på den jämfört med övriga juverdelar. Det är dock svårt att säga om någon av dessa parametrar är bättre än någon annan. I diagrammen avseende HCB+ vb ser vi att till exempel NAGase och LDH i princip följer varandra identiskt, ingen ger utslag mer eller tidigare än den andra. Resultaten i den här studien, som dock är mycket begränsad med bara tre kor, talar inte för att någon parameter skulle förändras tidigare än SCC vid mastit. Inget talar heller för att någon skulle vara bättre än SCC, men det betyder inte att de för den sakens skull heller är sämre. För ko HCB+ skulle flera parametrar fungera för att ställa diagnos om de analyserades tillräckligt ofta. Men en bra inflammationsindikator ska också kunna definieras med tydliga gränsvärden för diagnosen frisk och måste kunna identifiera subkliniker som inte har infektion och så kraftiga celltalsförändringar som HCB+ hade. I dessa avseenden hade ett flertal studerade parametrar en svaghet.

Vad säger SCC om mjölkens sammansättning?

I denna studie säger SCC inte mycket om mjölkens sammansättning med avseende på de analyserade parametrarna kasein, kaseintal, laktos och vassle. Dessa parametrar förändrades hos kon med den subkliniskt inflammerade juverdelen med infektion och ett kraftigt förhöjt SCC. Däremot sågs ingen tydlig påverkan på de juverdelar som hade ökat SCC på grund av en mera moderat inflammation utan infektion. Dock har SCC kritiserats som markör för mjölkens sammansättning och en bättre metod är att eventuellt jämföra juverdelarna inom kon.

Finns det någon parameter som skulle kunna användas för att diagnostisera en mild subklinisk inflammation?

Både ko HC och ko HCB+ var i hf subkliniskt inflammerade med ett celltal som inte översteg 156 000 celler/ml respektive 221 000 celler/ml. Varken **AP**, **Hp**, **kasein**, **kaseintal** eller **vassle** förändrades på ett sätt som särskiljde den subkliniskt inflammerade juverdelen från de övriga friska. Ökningen av **SAA** skiljde sig markant från juverdelarna med lågt SCC, men bara enstaka värden var $\geq 0,9$ mg/l, som anges som en övre gräns för god juverhälsa (Grönlund *et al.*, 2005). Medelvärdena för **LDH** var något högre för båda korna, i hf, men då ingen statistisk signifikans är beräknad är det svårt att uttala sig om det verkligen är någon statistisk hållbar skillnad. **NAGase och laktos** förändrades inte hos HCB+ i hf, men HC hade ett högre medelvärde för NAGase i hf, jämfört med övriga juverdelar, dock saknas statistisk signifikansberäkning. **Laktos** i hf hos ko HC hade ett något lägre medelvärde, jämfört med övriga juverdelar, men även här saknas statistisk signifikansberäkning. Vad säger CV (%)? Ingen av de analyserade parametrarna, förutom SAA, hade en högre CV (%), det vill säga varierade mer, i de lindrigt inflammerade hf hos korna HCB+ och HC. För ko HC gav ingen av de analyserade parametrarna något utslag i samlingsproverna. För att identifiera kor med subkliniskt inflammerade juver fungerar alltså SCC och SAA på juverfjärdedelsnivå förutsatt att man analyserar tillräckligt ofta och jämför de olika juverdelarna, inom kon, med varandra.

Hur mycket varierar parametrarna hos friska kor? Går det att sätta ett gränsvärde? Detta är av intresse för att kunna utveckla analysmetoder på konivå för att användas i praktiken. Om variationen är liten hos en parameter hos en frisk ko skulle eventuellt ett gränsvärde kunna bestämmas. Man skulle då med större säkerhet kunna säga att en ko som ligger utanför ett visst intervall indikerar mastit. Ett problem som tillstöter är att förändringen vid mastit också måste vara så pass stor att det märks även i samlingsprovet efter utspädning med mjölk från kons andra juverdelar. Det är i dagens läge inte rimligt att analysera parametrar på juverfjärdedelsnivå då tekniken i många fall saknas, det kostar för mycket pengar och det är inte praktiskt möjligt i flertalet mjölkningssystem. Om man analyserar på juverfjärdedelsnivå verkar SAA, i denna studie, fungera relativt bra för att diagnosticera subklinisk mastit (hf på korna HC och HCB+). Tydliga ökningar av SAA observerades men även de förhöjda värdena låg under det gränsvärde för en subkliniskt inflammerad juverdel som tidigare föreslagits i litteraturen (Grönlund *et al.*, 2005). De juverdelar med lågt SCC hos de tre korna i försöket hade värden för SAA under 0,35 µg/ml. De subkliniskt inflammerade juverdelarna (hf på korna HC och HCB+) hade värden mellan under analysmetodens detektionsgräns och 0,57 µg/ml respektive 0,22 och 1,03 µg/ml. Resultatet, i den här mycket begränsade studien, indikerar att gränsvärdet skulle kunna ligga på 0,4-0,5 µg/ml. Det är dock ett problem med användbarheten av SAA som mastitindikator i praktiken då den vid analys i samlingsmjölk är mycket osäker. Resultaten, i denna studie, visar entydigt det inte finns någon av de studerade parametrarna som i ett samlingsprov duger för att påvisa subklinisk mastit hos en ko som inte har tämligen tydliga celltalsförändringar.

Varför ska man identifiera kor med subklinisk mastit (ur lantbrukarens perspektiv)?

Det är viktigt att hitta de subkliniskt inflammerade djuren i en besättning av flera olika anledningar. Som nämndes i inledningen är SCC betalningsgrundande och man kan riskera att stängas av för leverans till mejeriet vid ett för högt SCC i tankmjölken. En ko med mastit producerar också mindre mjölk och har en stark inverkan på tankmjölkcelltalet. Det finns även en risk att kon smittar en annan frisk ko. Mjölk med högt celltal från kor med subklinisk mastit bör helst inte hamna i tanken. För att undvika detta kan det vara viktigt att identifiera vilken eller vilka juverdelar som har höga celltal och mjölka den/de vid sidan av och samtidigt kan resten av mjölken från kon levereras och ge betalt. Genom att inte skicka med mjölk från de inflammerade juverdelarna kan man få ner SCC i tankmjölken och eventuellt få mera betalt för den mjölk som levereras.

Utöver dessa anledningar är det även viktigt att hitta korna med subklinisk mastit eftersom de kan misstänkas ha en juverinfektion och eventuellt behöver sintidsbehandlas. En ko som under laktationen ökat i celltal och är infekterad riskerar att kalva in nästkommande laktation med en kvarstående infektion som kan ge ännu högre celltal och större produktionsbortfall eller eventuellt utvecklas till en klinisk mastit. Efter en provtagning som verifierar en infektion, speciellt av vissa bakterier, kan därför ibland sintidsbehandling med antibiotika vara relevant. Eftersom subkliniska mastiter orsakar ekonomiska förluster för lantbrukaren måste smitta inom besättningen minimeras. För att vidta sådana åtgärder måste man veta vilka kor som är smittkällor. En ko med mastit ska till exempel vara sist i mjölkningsordningen i ett konventionellt stall och det kan behövas en extra tvätt av spenkopparna i en robot efter mjölkning av mastitkor.

Konklusioner

- I ett friskt juver finns liten variation mellan mjölkningarna i mjölkens sammansättning och dess innehåll av inflammatoriska markörer
- I ett juver med höggradig subklinisk mastit finns stor variation mellan mjölkningarna i mjölkens sammansättning och dess innehåll av inflammatoriska markörer.

TACK

Karin Östensson, handledare, för stort engagemang och att du med din enorma kunskap tillfört många kloka kommentarer under arbetets gång!

Maria Åkerstedt, biträdande handledare, som från början gav mig chansen att medverka i forskningsprojektet som ansvarig för den bakteriologiska provtagningen och för att du engagerar dig, tar dig tid, är uppmuntrande och alltid har ett sprudlade glatt humör!

Linda Forsbäck, som tillsammans med Maria ansvarade för forskningsprojektet, för givande diskussioner om statistik och resultat!

Lotta Wall, som under försöket fixade och donade med det mesta och som kom som stöd på min muntliga presentation!

Branislav Lakic, för att du räknade neutrofilerna till mitt arbete!

Lars-Ove Sjaunja, som hjälpte till med den statistiska biten!

Madeleine ”Madde” Högberg, som var min stand-in under försöket ett par gånger så att jag fick några välbehövliga sovmorgnar!

Övriga i mjölkningsgänget som gjorde de tidiga mornarna under försöket mycket trevliga!

LITTERATURFÖRTECKNING

- Babaei, H. 2007. Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* 31, 419–425.
- Berglund, I. et al. 2004. Frequency of individual udder quarters with elevated CMT scores in cows' milk samples with low somatic cell counts. *Vet. Rec.* 155, 213.
- Berglund, I., Pettersson, G., Östensson, K. & Svennersten-Sjaunja, K. 2007. Quarter milking for improved detection of increased SCC. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 427–432.
- Brolund, L. 1985. Cell counts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 80, 1–123.
- Chagunda, M. G. G., Larsen, T., Bjerring, M. & Ingvarsen, K. L. 2006. L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *J. Dairy Res.* 73, 431–440.
- Daley, M. J., Coyle, P. A., Williams, T. J., Furda, G., Dougherty, R. & Hayes, P. W. 1991. *Staphylococcus aureus* mastitis: Pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 β and interleukin-2. *J. Dairy Sci.* 74, 4413–4424.
- Eckersall P. D., Young, F. J., Nolan, A. M., Knight, C. H., McComb, C., Waterston, M. M., Hogarth, C. J., Scott, E. M. & Fitzpatrick, J. L. 2006. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 89, 1488–1501.
- Fernley, H. N. and Walker, P. G. 1969. Studies on alkaline phosphatase (Transient-state and steady state kinetics of *E.coli* alkaline phosphatase). *Biochem. J.* 111, 187–194.
- Friggens, N. C., Chagunda, M. G. G., Bjerring, M., Ridder, C., Højsgaard, S. & Larsen, T. 2007. Estimating degree of mastitis from time-series measurements in milk: A test of a model based on lactate dehydrogenase measurements. *J. Dairy Sci.* 90, 5415–5427.
- Grönlund, U., Hultén, C., Eckersall, P. D., Hogarth, C. & Persson Waller, K. 2003. Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Res.* 70, 379–386.
- Grönlund, U., Hallén Sandgren, C. & Persson Waller, K. 2005. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Vet. Res.* 36, 191–198.

- Hamann, J. 2002. Relationships between somatic cell count and milk composition. *IDF Bulletin* 37, 256-259.
- Harmon, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77, 2103-2112.
- Hillerton, J. E. 1999. Redefining mastitis based on somatic cell count. *IDF Bulletin* 345, 4-6.
- Horadagoda, N. U., Knox, K. M. G., Gibbs, H. A., Reid, S. W. J., Horadagoda A., Edwards S. E. R. & Eckersall, P. D. 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.* 144, 437-441.
- Jansson Mörk, M., Wolff, S., Lindberg, A., Vågsholm, I. och Egenvall, A. 2009. Validation of a national disease recording system for dairy cattle against veterinary practice records. *In: Jansson Mörk, M. Validation of Disease Recordings in Swedish dairy Cattle. Doctorial Thesis No. 2009:66. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences.*
- Kitchen, B. J. 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48, 167-188.
- Kitchen, B. J., Middleton, G. & Salmon, M. 1978. Bovine milk N-acetyl- β -D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *J. Dairy Res.* 45, 15-20.
- Kaartinen, L. 1995. Physiology of the bovine udder. *In: M. Sandholm et al. (eds) The bovine udder and mastitis.* p. 14-23. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Jyväskylä.
- Korhonen, H. and Kaartinen, L. 1995. Changes in composition of milk induced by mastitis. *In: M. Sandholm et al. (eds) The bovine udder and mastitis.* p. 76-82. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Jyväskylä.
- Korhonen, H. and Sandholm, M. 1995. Antibacterial defence mechanisms of the udder. *In: M. Sandholm et al. (eds) The bovine udder and mastitis.* p. 37-48. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Jyväskylä.
- Kästli, P. 1967. Definition of mastitis. *A. Bull. Int. Dairy Fed.* Part 3:1.
- Larsen, T. 2005. Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by a fluorometric assay. *J. Dairy Res.* 72, 209-216.
- Mantere-Alhonen, S. 1995. Composition of milk. *In: M. Sandholm et al. (eds) The bovine udder and mastitis.* p. 24-30. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Jyväskylä.
- Mörk, M., Lindberg, A., Alenius, S., Vågsholm, I. och Egenvall, A. 2009. Comparison between dairy cow disease incidence in data registered by farmers and in data from a disease-recording system based on veterinary reporting. *Prev. Vet. Med.* 88, 298-307.
- Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 34, 565-578.
- Saloniemi, H. 1995. Use of somatic cell count in udder health work. *In: M. Sandholm et al. (eds) The bovine udder and mastitis.* p. 105-110. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Jyväskylä.
- Sandholm, M. 1995a. Inflammation in mastitis. *In: M. Sandholm et al. (eds) The bovine udder and mastitis.* p. 59-75. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Jyväskylä.

- Sandholm, M. 1995b. Detection of inflammatory changes in milk. *In*: M. Sandholm et al. (eds) The bovine udder and mastitis. p. 89-104. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Jyväskylä.
- Schüttel, M. 1999. Vergleich von N-acetyl- β -D-glycosamidase-aktivitäten (NAGase) in milch, blut und harn beim laktierenden rind. Dissertation, Dr. Med. Vet. Tierärztslicher Hochschule Hannover, Germany.
- Sjaastad, ØV et al. 2003. Physiology of domestic animals. p. 672-673. Scandinavian Veterinary Press, Oslo.
- Sjaunja, L.-O. 1986. Day-to-day variation in milk yield, milk composition and somatic cell count. International committee for recording of the productivity of milk animals. ICRPMA 25th session. May 21-23.
- Spörndly, R. 2003. Fodertabeller för idisslare 2003. Report 257. 1-96. Avdelningen för idisslare – näringslära och skötsel, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala, Sverige. ISSN 0347-9838.
- Tanhuanpää, E. 1995. The structure of the udder. *In*: M. Sandholm et al. (eds) The bovine udder and mastitis. p. 7-13. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Jyväskylä.
- Zank, W. and Schlatterer, B. 1998. Assessment of subacute mammary inflammation by soluble biomarkers in comparison to somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows. J. Vet. Med. A 45, 41-51.
- Åkerstedt, M. 2003. Förändras mjölkens proteinsammansättning i separate juverdelar i samband med höga celltal (SCC)? Examensarbete 181, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Uppsala.
- Åkerstedt, M., Björck, L., Persson Waller, K. and Sternesjö, Å. 2006. Biosensor assay for determination of haptoglobin in bovine milk. J. Dairy Res. 73, 299-305.
- Östensson, K. 1993. Variations during lactation in total and differential leukocyte counts, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, antitrypsin and serum albumin in foremilk and residual milk from non-infected quarters in the bovine. Acta vet. scand. 34, 83-93.